

博士論文

機能性食品の
抗インフルエンザウイルス効果および
免疫賦活効果

黒田 玲子

目次

第 1 章 序論	6
1-1 はじめに	7
1-2 インフルエンザウイルスについて	8
1-3 カリンについて	10
1-4 乳酸菌の免疫賦活作用に関する研究について	11
1-5 本研究の目的	13
第 2 章 カリン抽出物の抗インフルエンザウイルス活性	28
2-1 序	29
2-2 材料と方法	30
2-2-1 細胞株およびウイルス	30
2-2-2 カリンの抽出および各分画物のポリフェノール量測定	30
2-2-3 感染中和効果確認試験	31
2-2-4 動物を用いた感染実験	32
2-2-5 データ処理	33
2-3 結果	33
2-3-1 インフルエンザウイルスに対する感染阻害効果	33
2-3-2 活性成分の精製	34

2-3-4	新型インフルエンザウイルスに対する感染阻害効果.....	35
2-3-5	カリン抽出物 CSE50 のマウスにおけるインフルエンザウイルス に対する感染阻害効果	35
2-4	考察.....	36
2-5	結論.....	37
第 3 章 カリン抽出物によるインフルエンザウイルス感染阻害機構の解明		
	50
3-1	序.....	51
3-2	材料と方法.....	53
3-2-1	細胞株およびウイルス	53
3-2-2	カリン抽出物の調製と分析	53
3-2-3	感染中和効果確認試験	54
3-2-4	Hemagglutination (HA) assay.....	54
3-2-5	Hemagglutination inhibition (HI) assay.....	54
3-2-6	Hemolysis assay	55
3-2-7	免疫ブロット法によるウイルスタンパクの検出.....	55
3-2-8	nucleoprotein (NP) mRNA, cRNA, vRNA の定量	57
3-2-9	電子顕微鏡によるウイルス粒子観察.....	59
3-3	結果.....	59

3-3-1 阻害メカニズムの解析	59
3-3-2 電子顕微鏡による観察	64
3-4 考察	65
3-5 結論	69
第4章 <i>Leconostoc mesenteroides</i> NT048 含有	
チョコレートの免疫機能改善効果.....	83
4-1 序	84
4-2 材料と方法	87
4-2-1 試験デザインおよび試験群	87
4-2-2 被験食	87
4-2-3 被験者および倫理的配慮	87
4-2-4 試験スケジュール	89
4-2-5 測定項目	89
4-2-5 目標症例数の設定および統計解析	92
4-3 結果	93
4-3-1 免疫学的指標	94
4-3-2 安全性評価	95
4-3-3 主観的健康感	95
4-4 考察	96

4-5 結論	98
第 5 章 総合討論	111
引用文献	119
謝辞	140

略語リスト

EPS	Exopolysaccharide
IgA	Immunoglobulin A
NK 細胞	Natural killer cell
NTM048	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> NTM048
MDCK	Mardin-Darby canine kidney
MEM	Eagle' s minimum essential medium
TGS	Tris-Glucose-Saline
HA	Hemagglutination
HI	Hemagglutination inhibition
PFU	Plaque forming units
vRNPs	Viral ribonucleoprotein proteins
vRNA	Viral RNA
cRNA	Complementary RNA
NP	Nucleoprotein
BMI	Body Mass Index
TCPI	T cell proliferation index

第 1 章

序論

1-1 はじめに

厚生労働省発表の令和元年簡易生命表の概況[1]によると、男性の平均寿命は 81.41 年、女性の平均寿命は 87.45 年となり、男女ともに過去最高を更新した。他国と比較しても、男性は香港、スイスに次いで世界第 3 位、女性は香港に次いで第 2 位の平均寿命の長さであり、日本は世界有数の長寿国であるといえる。日本の総人口は前年に比べ 29 万人減少している状況下で、少子化が進んでいることも相まって、総人口に占める 65 歳以上の高齢者の割合は過去最高の 28.7% (3,617 万人) を記録した[2]。この数値はイタリア (23.3%)、ポルトガル (22.8%)、フィンランド (22.6%) などを抑えて、日本が最も高い。なお日本における女性高齢者は 2018 年発表時に初めて 2,000 万人を超え、2020 年は 2,044 万人 (女性総人口の 31.6%) であり、女性高齢者数は男性高齢者数より 471 万人多い。高齢化社会において重要な課題となっているのが、身体の機能低下により生じる医療費増加である。厚生労働省の発表[3]によると、2019 年度の医療費は 43.6 兆円であり、前年度と比較して 2.4%の増加となった。今後の人口構成の遷移予測を考慮すると、更なる医療費の増加が懸念される。

一方で、高齢者の暮らしに着目すると、活動的な生活を送っている姿がデータから浮かび上がってくる。2018 年の就業者数は 862 万人と過去最多を記録し、15 歳以上の就業者総数に占める高齢就業者の割合は 13.3%であった。高齢者の就業者数は増加し続けており、10 年前と比較して 60～64 歳、65～69 歳、70～74 歳の就業率は、それぞれ 11.6 ポイント、10.4 ポイント、8.4 ポイント伸びている。「あなたは何歳まで収入を伴う仕事をしたいですか」という質問に対して、60 歳以上の就労者の約 4 割が「働けるうちはいつでも」働きたいと回答しており、70 歳もしくはそれ以上と回答したものを合計すると約 8 割が高齢期においても就労したいという意欲が高いこ

とを示している[4]。また、ネットショッピングにおける「医薬品・健康食品」の構成比が非高齢者世帯と比較して 1.2 倍高いことが報告されており[2]、「健康」を維持しつつ「生き生き」と活動したいという高齢者が多いことがうかがえる。

健康寿命をのばすために注目されているのが、特定保健用食品や機能性表示食品といった食品である。特定保健用食品は現在 1,074 品（2020 年 3 月時点）が厚生労働省により表示許可・承認されており、その用途別構成比（2019 年度）は、整腸作用が 59.5%、中性脂肪・体脂肪関連が 24.4%であった（Fig. 1-1）。機能性表示食品は食品の機能を表示できる食品として 2015 年に新たに加わった制度である。特定保健用食品で許可されている機能に加えて、記憶力を維持するタイプやストレスや疲労を低減するタイプなど様々なタイプの食品が販売されている。2020 年 11 月段階で 3,412 件の届出が提出されており、1,530 件が現在販売中である。特定保健用食品や機能性表示食品を筆頭に、今後ますます食品で疾病予防および健康寿命をのばそうとする要望が高まることが予想される。

1-2 インフルエンザウイルスについて

インフルエンザは、冬季を中心に流行する急性感染症であり、発熱・のどの痛み・関節痛が主な症状である。インフルエンザを予防する手段として、流行前の予防接種が有効であると考えられているが、感染を完全に防げるわけではない。実際、18-65 歳が対象となっているメタアナリシスによると、インフルエンザウイルスに対する予防接種の効果は 59%（95%信頼区間：51-67%）にすぎないという報告がある[5]。特に、小学生においてはワクチンを接種しても依然としてインフルエンザ罹患率が高いこと[6]が報告されており、罹患した児童から学校内や同居している家族に感染が広がっていく

形で、インフルエンザウイルスの感染拡大を完全に抑えることは不可能に等しい。

インフルエンザを引き起こすインフルエンザウイルスは直径1万分の1ミリメートル程度のエンベロープ膜を有するRNAウイルスであり、A型・B型・C型の3つの型がある。A型とB型インフルエンザウイルスの粒子表面には赤血球凝集素（Hemagglutinin; HA）とノイラミニダーゼ（Neuraminidase; NA）の2種類の糖タンパク質がスパイク状に突き出しており、内部には8本に分節した遺伝子RNA（HA、NA、PA、PB1、PB2、M、NP、NS）が存在する[7]（Fig. 1-2）。一方、C型インフルエンザウイルスはHAとNAの2つの遺伝子はなく、HEを含む7分節（HE、PA、PB1、PB2、M、NP、NS）で構成されている。A型インフルエンザウイルスが他の二つと大きく違う点は亜型の存在である。B型とC型インフルエンザウイルスの型は1種類のみだが、A型インフルエンザウイルスは16種類のHA（H1～H16）と9種類のNA（N1～N9）の組み合わせにより、計算上144種類の亜型が存在することになる（Table 1-1）。インフルエンザウイルスの変異には、連続抗原変異（抗原ドリフト）と不連続抗原変異（抗原シフト）の2種類あることが知られている。連続抗原変異は、HAとNA上のアミノ酸変異により抗原の特性が少しずつ変化することを指し、毎年のように新しい抗原変異株が出現する。一方、不連続抗原変異は、流行していたウイルスと異なるHA亜型またはNA亜型をもつウイルスが出現し、取って代わることを指す（Fig. 1-3）。不連続抗原変異をおこしたウイルスに対する免疫は多くの感染者で獲得されておらず、過去の感染で形成された抗体は有効ではないため、2009年の新型インフルエンザウイルス（H1N1）のような世界的大流行（パンデミック）を引き起こす可能性が高まる。

インフルエンザウイルスの感染を阻害するためには、上皮細胞への吸着

の阻害、細胞への侵入の阻害、遺伝子の転写・複製の阻害、蛋白質の合成阻害、細胞からの放出の阻害などが考えられ、これらのステップをターゲットとした抗ウイルス薬[8]が開発されている (Fig. 1-4)。現在までに、M2 イオンチャネル阻害剤 (アマンタジンなど) や NA 阻害剤 (ザナミビル、オセルタミビルなど) が知られている。さらに 2018 年 3 月には Cap エンドヌクレアーゼ阻害剤 (バロキサビル) も加わり、臨床的に広く使用されている。これらはインフルエンザの症状が軽減するまでの時間を短縮するのに効果的であるが、耐性株や有害事象が報告されており[9]、安全性の高い抗インフルエンザウイルス薬が望まれている。

1-3 カリンについて

カリン (*Chaenomeles sinensis*) は、中国が原産の落葉性高木である。カリン果実部は榲桲 (メイサ) と呼ばれ、去痰、鎮咳、鎮痛等を薬効とした漢方として処方されている。非常に硬く生食には向いていないため、カリン酒や砂糖漬け、シロップ等にして食されている。またカリンは熟してくると芳醇な香りがするため、芳香を楽しむために果実を玄関先に飾られることもある。日本では、カリンの果実を焼酎に漬け込んだカリン酒を鎮咳や去痰を目的として利用するケースもある。

大澤ら[10]は、カリンの鎮咳・去痰作用に着目し、溶血性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) に対する抗菌活性及び本菌が産生する溶血毒 (ストレプトリジン O) に対する阻害活性を評価することで、喉に対する有効成分の解明に取り組んだ。溶血性連鎖球菌は扁桃腺や咽頭炎の原因菌で知られている。カリンの成分の中で、オレアノール酸、ポモール酸、2-オキソポモール酸、ウバオールのようなトリテルペン化合物に抗菌活性を、 β -シトステロールや 2-オキソポモール酸に溶血毒素阻害活性を確認した (Fig.

1-5)。また大澤らはカリンの抗炎症作用についても報告している[11][12]。抗炎症作用について、ヒアルロニダーゼ阻害活性と肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制活性という2つの指標を用いて評価している。ヒアルロニダーゼ阻害効果のある成分として、高分子ポリフェノールやカテキン及びエピカテキンを見出しており、ヒスタミン遊離抑制効果については、プロトカテキ酸や高分子ポリフェノールとポリフェノール類に高い活性があることを報告している。これらカリン中のポリフェノール成分について Fig. 1-6 に示した。

1-4 乳酸菌の免疫賦活作用に関する研究について

国内における健康志向食品の市場に目を向けると、免疫賦活作用関連の食品市場は、2012年頃からヨーグルトを中心に伸びてきており、2018年は1,370億円（前年比5.1%増）が見込まれている[13](Fig. 1-7)。SARS-CoV-2の感染拡大をうけて今後ますます注目されると推察される。これらの免疫賦活作用関連の食品として活躍している食材の一つが乳酸菌である。

1908年にノーベル生理学・医学賞を受賞した Ilya Ilyich Mechnikov は、老化は腸内の腐敗菌による毒素によって引き起こされ、腐敗菌の増殖を抑える乳酸菌を増やすことで平均寿命を延ばすことができるという理論を主張した。以来、多くの研究者が乳酸菌の機能性に注目しており、その生理学的効果については多数報告されている[14][15]。近年、菌体外多糖類である EPS (Exopolysaccharide) および脂肪酸のような乳酸菌由来の代謝産物がヒトの健康に対して、有効であることが明らかになってきている[16-26]。例えば、リノール酸は *Lactobacillus plantarum* により、共役脂肪酸である共役リノール酸に変換される (Fig. 1-8) [16]。共役リノール酸を豊富に含むバターを摂取すると、健常者において全身性の炎症メディエーターが低減され

たこと [17]、共役リノール酸含有ソフトゲルの 8 週間摂取により、非アルコール性脂肪肝疾患患者では血糖応答、脂質プロファイル、酸化ストレスが改善されたこと [18] が確認されている。共役リノール酸は、ベニバナ油由来のリノール酸を化学的に異性化することによって合成することができるが、同時に様々な副生成物も生成されるため、乳酸菌の代謝により得られる共役リノール酸に注目が集まっている。*Lactobacillus casei* strain Shirota および *Lactococcus lactis* YIT 2027 は、高いグルタミン酸デカルボキシラーゼおよび高いプロテアーゼ活性を有する。これらを混合培養すると、 γ -アミノ酪酸を含有する発酵乳が得られる [19]。 γ -アミノ酪酸の摂取は、軽度な高血圧症患者において血圧が有意に低下することが報告されている [19]。*Lactobacillus helveticus* は、降圧ペプチドである Val-Pro-Pro と Ile-Pro-Pro を産生する [20] [21]。また、EPS は免疫機能を高めることが報告されている [22]。グルコースとガラクトースからなるケフィランは、*Lactobacillus kefiranofaciens* によって産生される EPS の 1 つである。ケフィランの経口投与は、腸粘膜の固有層おけるマクロファージおよび Immunoglobulin A (IgA) の産生量を増加させる [23]。*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL 1073R-1 が産生する酸性 EPS も免疫パラメータに影響を与える。酸性 EPS をマウスに経口投与すると、ナチュラルキラー (NK) 細胞が活性化されることが報告されている [24] (Fig. 1-9)。*L. bulgaricus* OLL 1073R-1 で発酵したヨーグルトを摂取すると、健常者において NK 細胞活性が増加し、風邪に対する抵抗力が上昇したことが報告されている [25] [26]。

本研究の対象である *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048 (以下、NTM048) はエンドウ豆から単離された植物由来の乳酸菌であり、主にグルコースとフルクトースで構成される 10~40 kDa の EPS を菌体外に大量に産生する。NTM048 を含む餌をマウスに 2 週間経口投与すると、糞便中の IgA レ

ベルが上昇することが報告されている[27]。NTM048 由来の EPS を 3 週間マウスに投与し、脾細胞中の T 細胞のサブタイプを比較したところ、CD3⁺ T 細胞および CD4⁺ T 細胞が増加しており、全身免疫系に影響を与えることが明らかになっている[28]。マウスにおいて、NTM048 の摂取により免疫賦活効果を高めることが示唆されたが、ヒトの免疫系に対する影響は明らかになっていなかった。

本研究では、健常者を対象として、NTM048 をチョコレートに配合し、その免疫賦活効果を明らかにすることを目的として実施した。チョコレートは、紀元前古代メキシコで誕生し、当時は『神様の食べ物』といわれるほど高価な嗜好品であったが、現在では最もよく食べられている身近な菓子の一つとなっており、チョコレート菓子の生産量は年々増加している[29](Fig. 1-10)。以前の研究において糞便解析により、乳酸菌 *Lactobacillus brevis* NTT001 配合チョコレートを摂取すると、NTT001 が生菌の状態で消化管を送達することが報告されており[30]、チョコレートはプロバイオティクスを保護するための有用なツールとなり得ることが示唆された。一方、チョコレートの原材料の一つであるカカオの生物学的効果についても多数報告されている。例えば、カカオに含まれるポリフェノール（カカオポリフェノール）と ω -3 脂肪酸は心血管疾患のリスクを下げたり[31]、カカオポリフェノールなどの成分が肌の老化を改善したりすることが報告されている[32]。乳酸菌とカカオポリフェノールの人の健康に対する相乗効果が期待できる。最後に、身体検査、尿検査、および血液検査を実施し、NTM048 配合チョコレートの安全性について確認した。

1-5 本研究の目的

1-1 で記した社会的背景をうけて、健康寿命を延ばすために、運動を積極

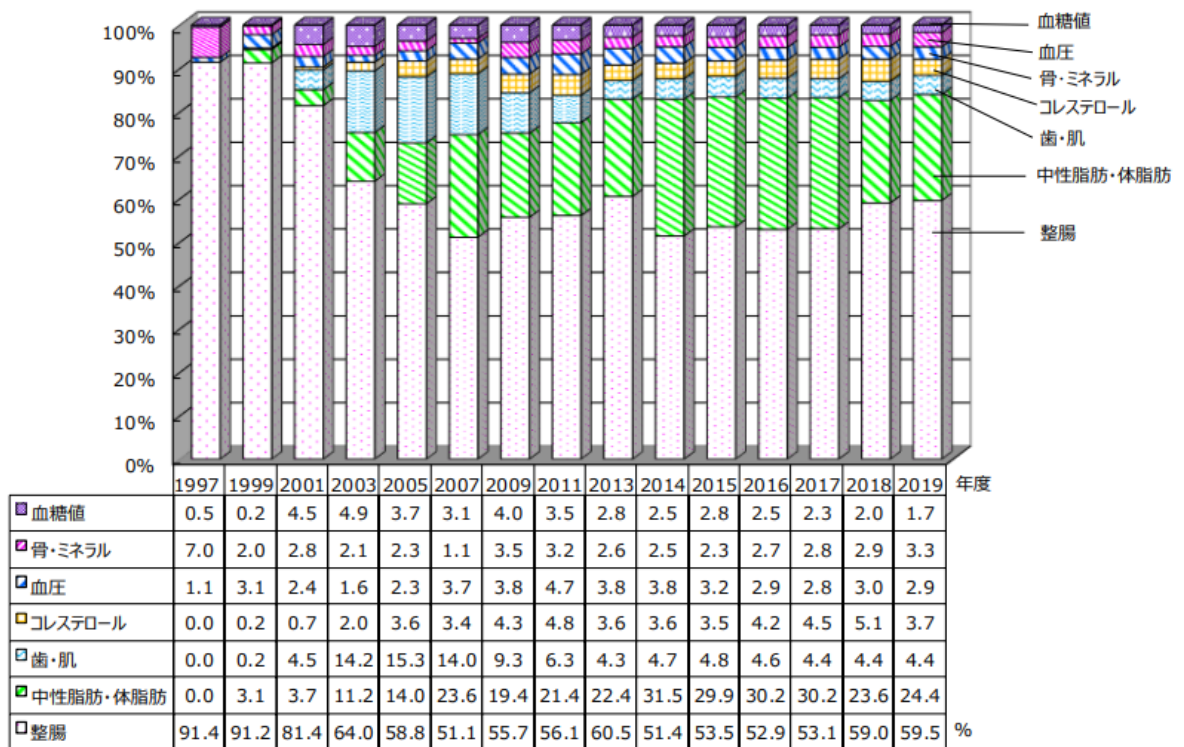
的に行う、禁煙するといった予防医学の考え方を推進することが肝要であり、特定保健用食品や機能性表示食品といった食品をはじめとする「食」が寄与するところは大きいと考える。人々の健康を維持する方法として、感染症などの外的要因の防御と、免疫機能の低下といった内的要因の改善という、2つのアプローチにより研究を実施した。

本研究ではまず、外的要因の防御として、他の世代と比較して免疫機能が低い乳幼児や高齢者で重症化しやすく、70歳以上では入院に至るほど重症化するケースが多い[33]インフルエンザに着目した。インフルエンザに対しては、多くの抗ウイルス薬が開発されているが、耐性株や有害事象が報告されている[9]ため、感染阻害効果が高く、安全性にも問題がない日常的に利用できる抗インフルエンザウイルス活性を有する機能性食品の開発が必要であると考えた。我々は既に、126種の生薬・ハーブ抽出物の抗インフルエンザウイルス活性についてスクリーニングを実施し、9種の有効な素材を見出している（Table 1-2）。本研究では、これらの有効素材のうち、食経験が豊富であり、かつ古くから鎮咳や去痰作用が知られているカリン（花梨）に着目し、インフルエンザウイルス感染阻害効果を評価、解析した。

一方、カリンのインフルエンザウイルス感染阻害に関する研究を行っていく中で、インフルエンザウイルスだけではなく様々な感染症と戦うために、免疫機能そのものを高めるような食品の提供が必要であるという考えに至った。免疫機能は加齢とともに低下することが知られており[34]、高齢者が様々な感染症に罹患しやすいのは免疫機能の低下が原因の一つと考えられる。免疫機能を高める食品類として、キノコ類や乳酸菌などの発酵食品が知られており[35]、その中でも乳酸菌は、ヨーグルトやチーズ、味噌や漬物など様々な発酵食品の製造において重要な役割をもつ最も身近な

微生物の一つである。2020年9月には、国内初となる免疫機能の分野で乳酸菌配合の食品が機能性表示食品として受理され、ますます注目されている。本研究では、マウスにおいて免疫賦活効果が確認されている NTM048 を配合したチョコレートを用いて、健常者の免疫機能にどのような影響を与えるのかを明らかにするために、評価及び解析を行った。

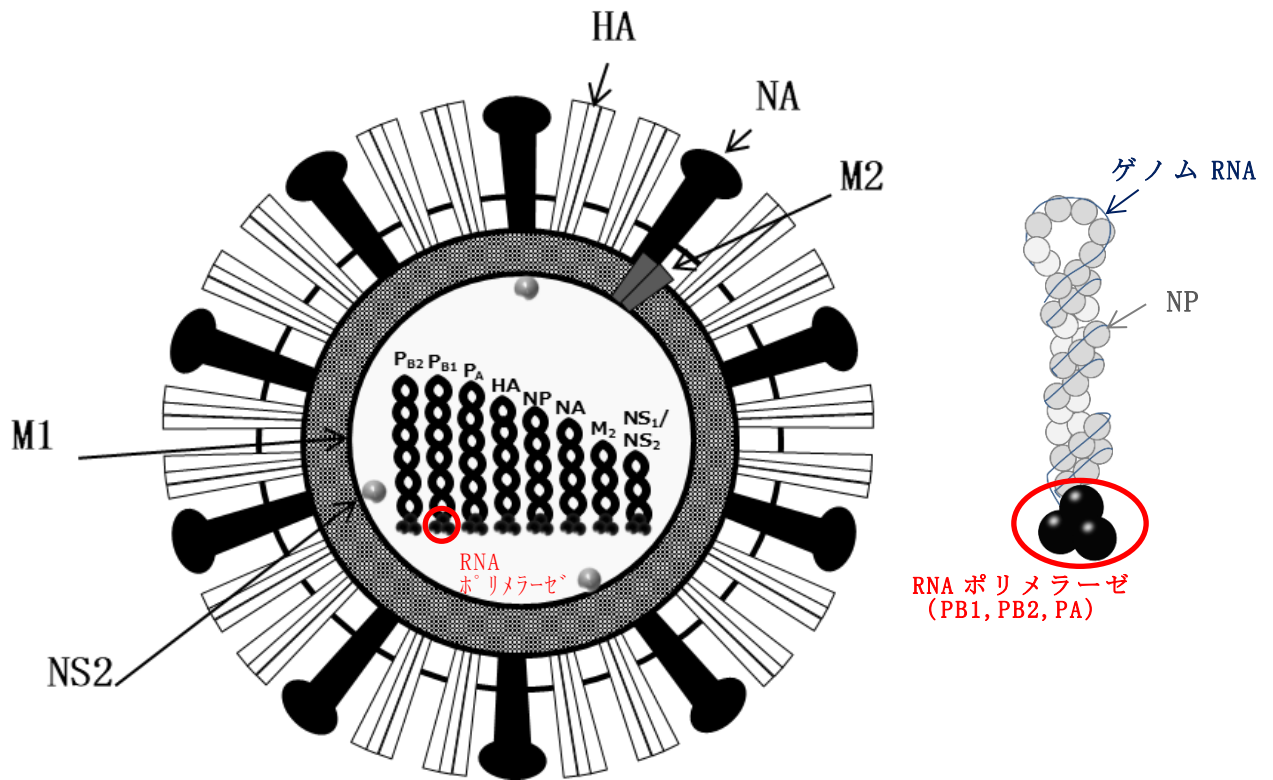
本論文の構成は以下の通りである。まず、第2章および第3章では、カリン抽出物のインフルエンザウイルスに対する感染阻害効果に関して研究を行った。第2章では、MDCK(Mardin-Darby canine kidney)細胞を用いたインフルエンザウイルス感染中和効果を指標として、カリンの活性成分の精製および構成成分の分析を行った。さらにマウスを用いて、カリン抽出物の生体内におけるインフルエンザウイルスの感染阻害効果・予防効果・治療効果を検討した。続いて第3章では、カリン抽出物がインフルエンザウイルスのどの増殖過程に対して阻害するのかを明らかにした。第4章では、免疫賦活効果が期待できるような機能性食品の開発を目的として、NTM048 配合チョコレートを用いて、健常者を対象に免疫賦活効果検証試験を行った。また、身体検査、尿検査、および血液検査を実施し、NTM048 配合チョコレートの安全性について確認を行った。最後に第5章では得られた研究結果に基づいて、総合討論を行い、今後の展望について記述した。



公益財団法人 日本健康・栄養食品協会 HP より抜粋 (2020.4.1)

Fig. 1-1 特定保健用食品の用途別市場構成推移

特定保健用食品は2020年3月時点で1,074品が表示許可・承認されている。2019年度に注目すると、整腸作用が59.5%、中性脂肪・体脂肪が24.4%を占めており、これらの作用に着目している食品が多いことがわかる。



Lamb R.A. *et al.* [7]を参考に作成

Fig. 1-2 A型インフルエンザウイルスの構造模式図

A型インフルエンザウイルスの表面には、宿主細胞への侵入に必要なHA（ヘマグルチニン）と増殖したウイルスが細胞から離れる際に必要なNA（ノイラミニダーゼ）がスパイク状に発現している。NP（ヌクレオキャプシドタンパク質）はゲノムの複製・転写にかかわるタンパク質であり、PB1、PB2、PAで構成されているRNAポリメラーゼとともに、vRNAに結合してRNP複合体を形成する。M1タンパク質はウイルスエンベロープの内側の裏打ち及び細胞挙動に関わっており、M2タンパク質はイオンチャンネルとして機能している。NS1タンパク質は転写段階後において宿主遺伝子の発現を抑制する働きを担う。NS2タンパク質はM1タンパク質と共にウイルスに取り込まれウイルス粒子を形成する等が知られている。

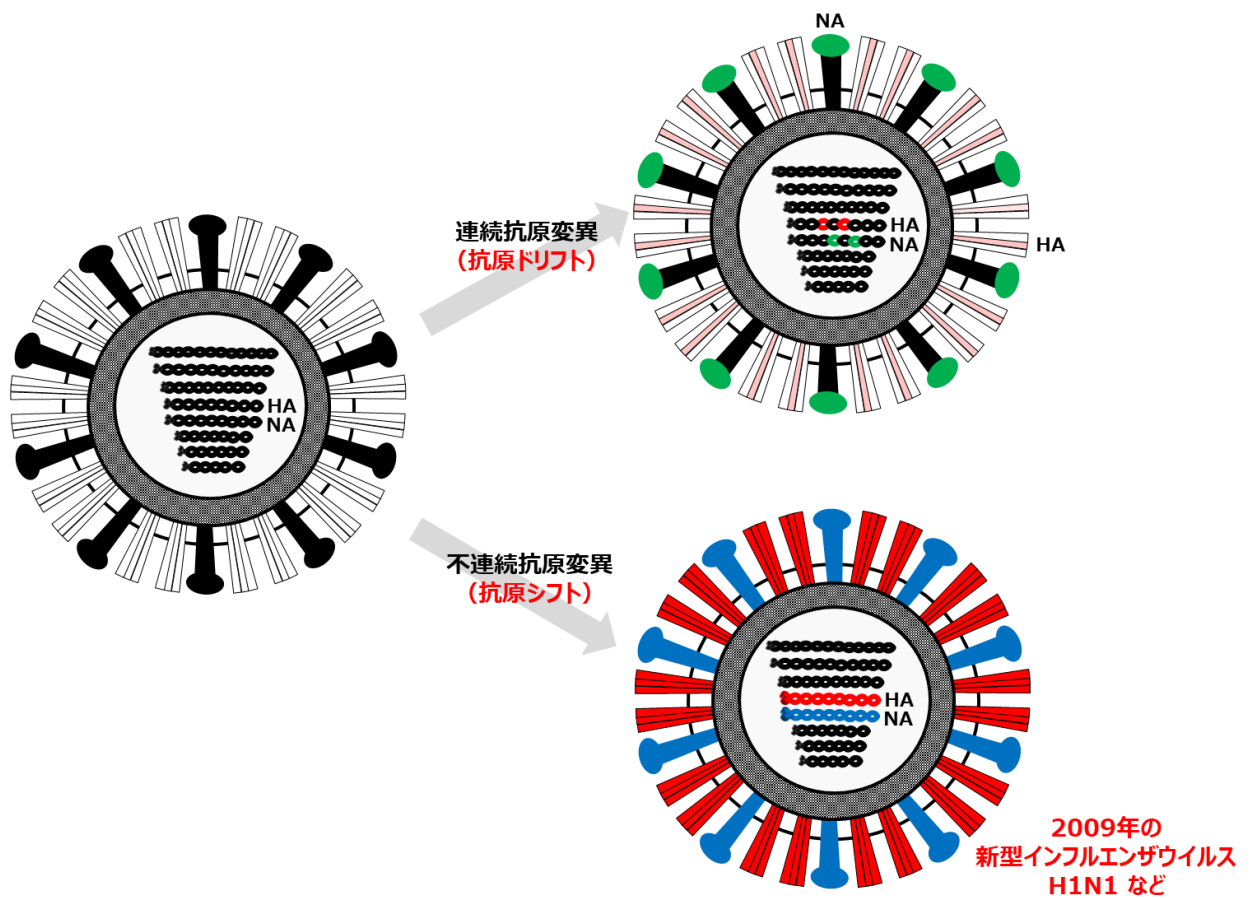
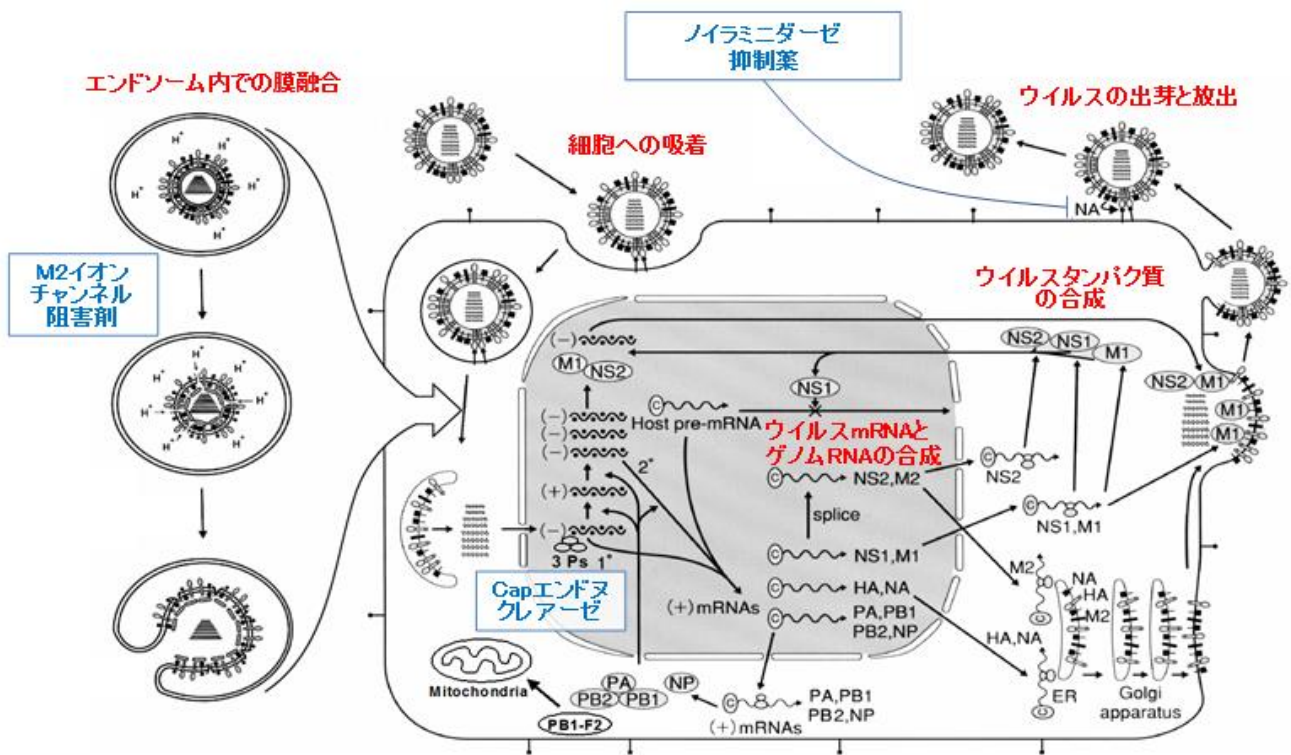


Fig. 1-3 インフルエンザウイルスの変異

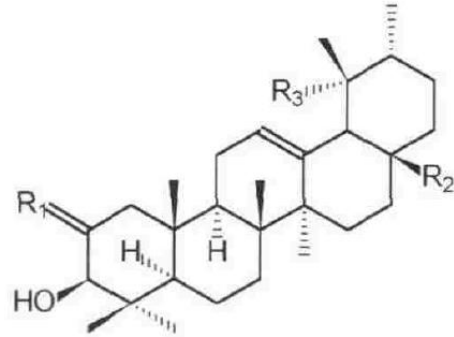
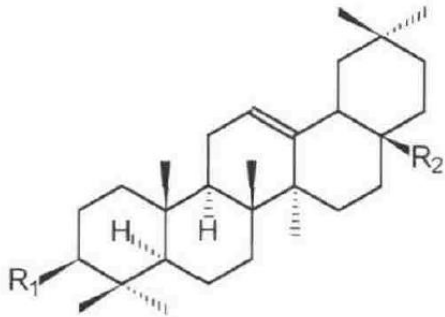
インフルエンザウイルスの変異には、連続抗原変異（抗原ドリフト）と不連続抗原変異（抗原シフト）の2種類ある。不連続抗原変異をおこしたウイルスに対する免疫は多くの感染者で獲得されていないため、2009年の新型インフルエンザウイルス（H1N1）のような世界的大流行（パンデミック）を引き起こす可能性がある。



Lamb RA and Krug RM [36]改変

Fig. 1-4 インフルエンザウイルスの感染過程とインフルエンザ治療薬の作用点

インフルエンザウイルスの感染過程は、ウイルスのヘマグルチニン（HA）が上皮細胞表面に発現している糖タンパク質に結合し、吸着することでスタートする。吸着後、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ（侵入）、宿主細胞と膜融合を起こし、脱殻する。脱殻後、ウイルス mRNA とゲノム RNA の合成、ウイルスタンパク質の合成を経て、子孫ウイルスが細胞外に放出される。インフルエンザウイルスに対する治療薬の作用点は、上記のいずれかの段階を阻害している。



【オレアナン型トリテルペン】

1. $R_1=OH$, $R_2=COOH$ オレオノール酸
2. $R_1=OAc$, $R_2=COOH$ 3-O-アセチルオレオノール酸
3. $R_1=OH$, $R_2=CH_2OH$ エトロシオール

【ウルサン型トリテルペン】

1. $R_1=H_2$, $R_2=COOH$, $R_3=OH$ ホモール酸
2. $R_1=O$, $R_2=COOH$, $R_3=OH$ 2-オキシホモール酸
3. $R_1=H_2$, $R_2=CH_2OH$, $R_3=H$ ウハオール

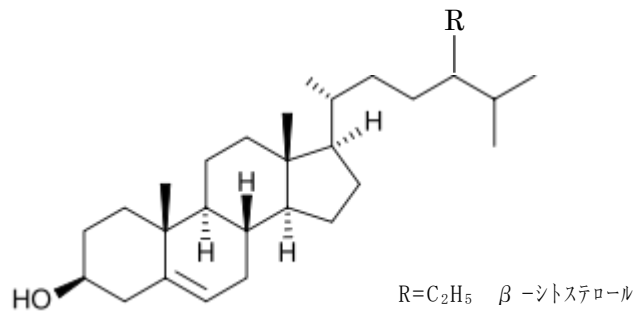
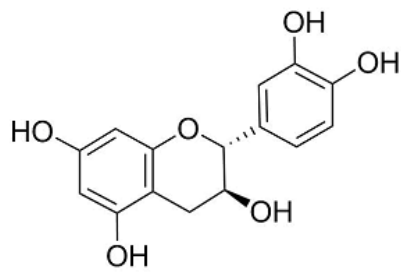
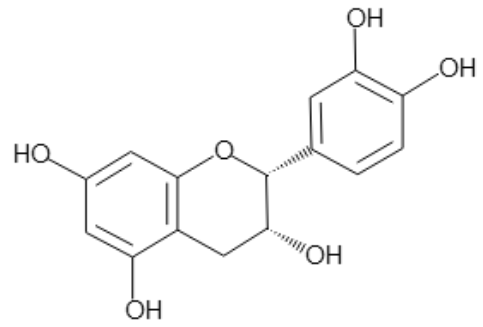


Fig. 1-5 カリン中の *Streptococcus pyogenes* に対する抗菌活性成分および抗溶血活性成分

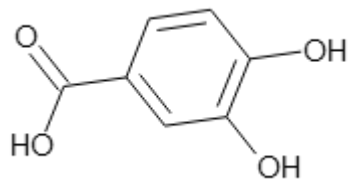
大澤ら[10]により、*Streptococcus pyogenes* に対する抗菌活性および本菌が産生する溶血毒に対する阻害活性を指標にカリン中の有効成分が同定されている。図中のトリテルペン類は本菌に対する抗菌活性を、 β -シトステロールや2-オキシホモール酸は本菌が産生する溶血毒に対して阻害活性を示した。



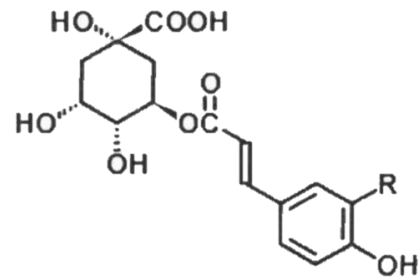
カテキン



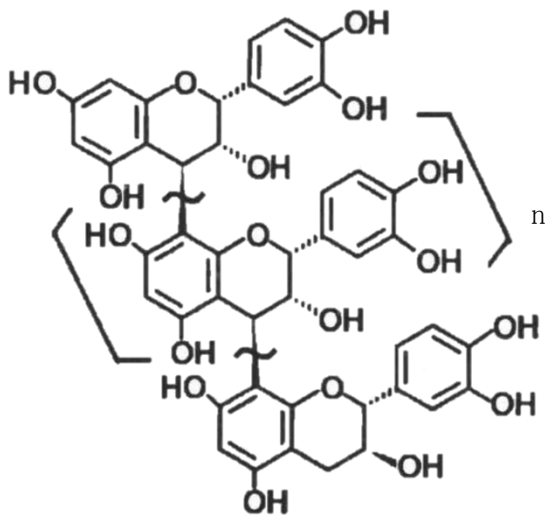
エピカテキン



プロトカテキ酸

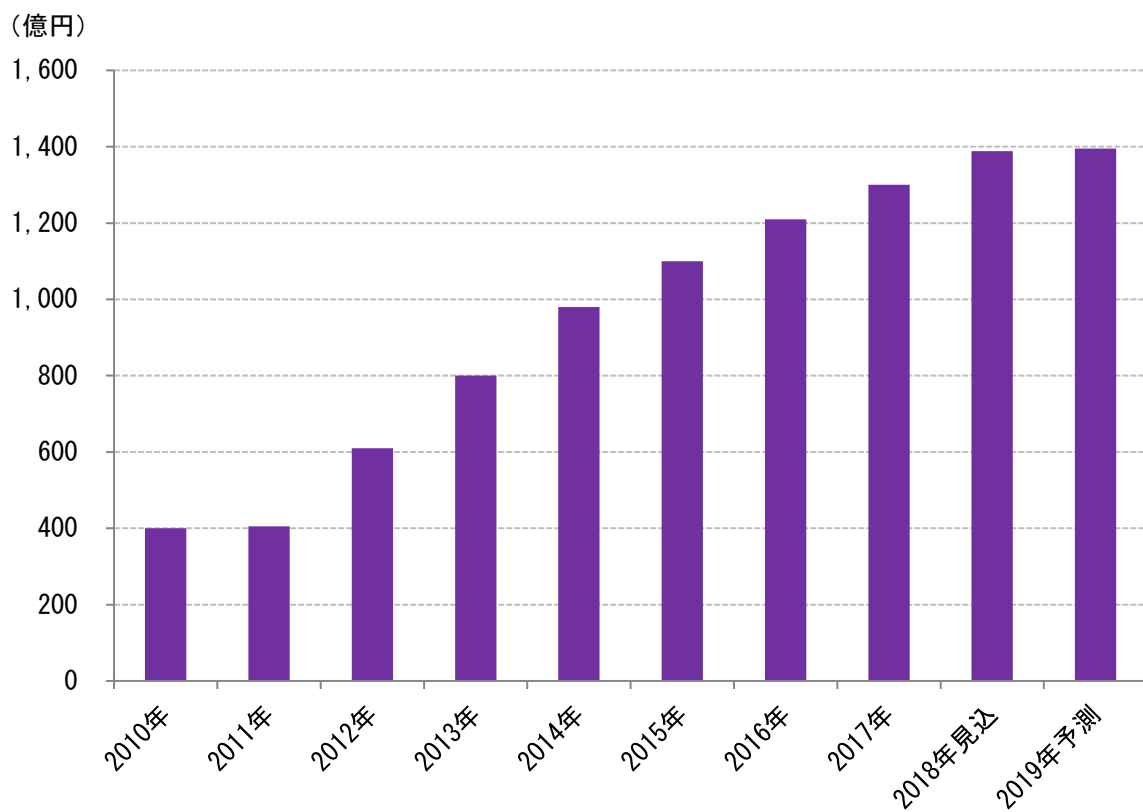


R=H 3-O-*p*クマロイルキナ酸
R=OH クロケニン酸



高分子ポリフェノール

Fig. 1-6 カリン中のポリフェノール類



富士経済プレスリリース第 18115 号より引用 [13]

Fig. 1-7 高機能乳酸菌やプロポリスなど免疫機能の強化を訴求した飲料や食品の日本における市場規模調査

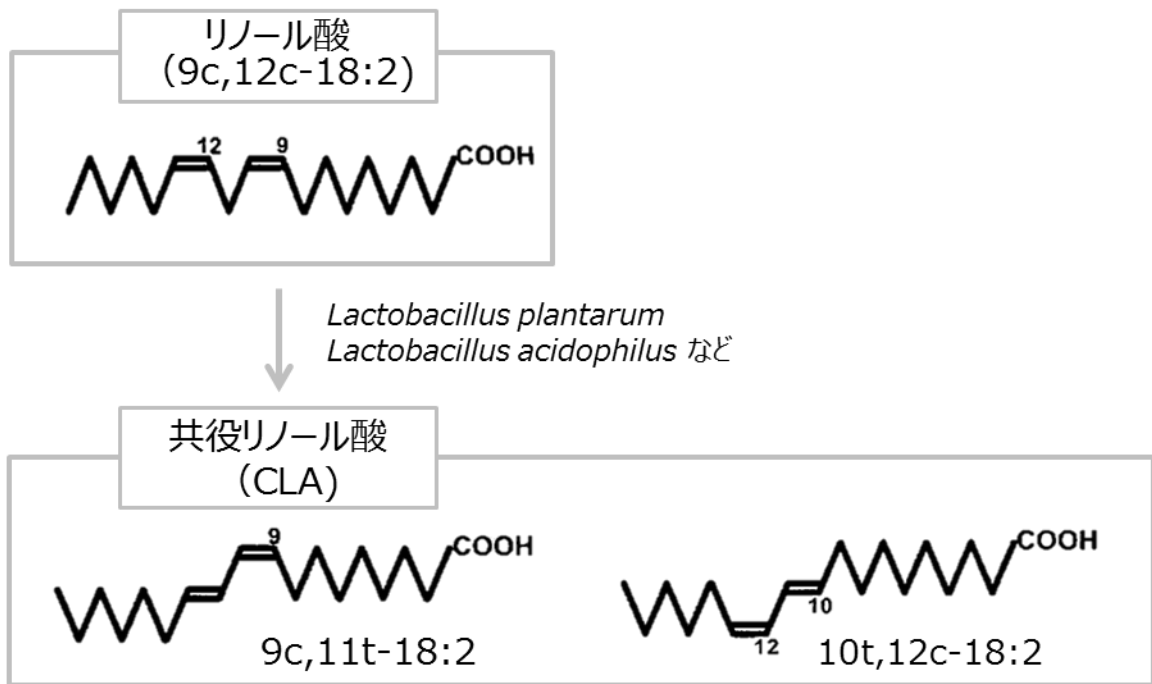
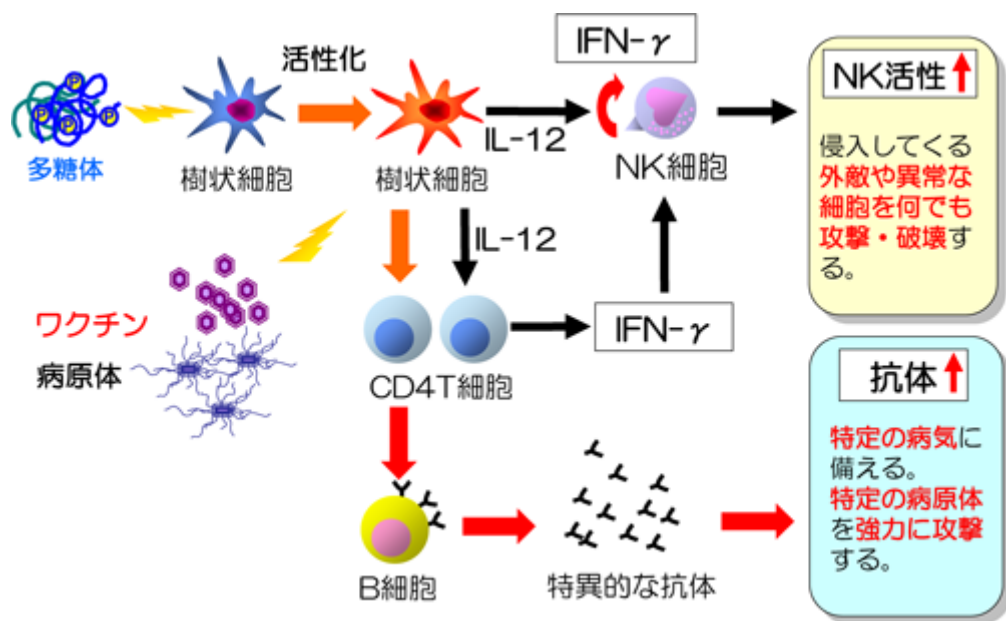


Fig. 1-8 共役リノール酸の構造

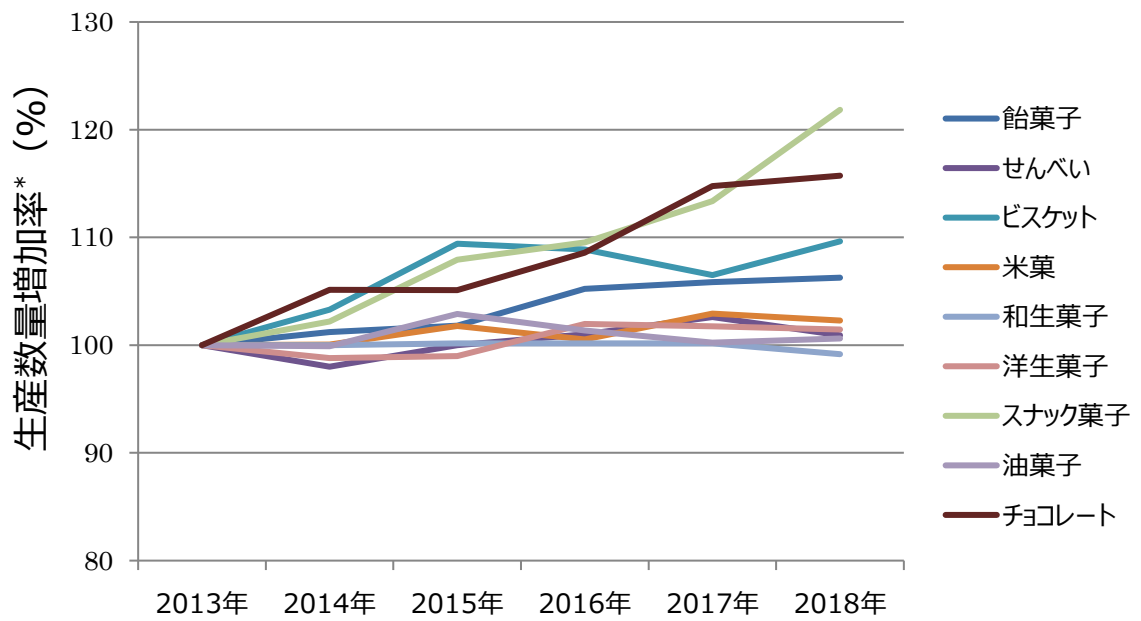
Lactobacillus plantarum などの乳酸菌によりリノール酸は共役脂肪酸である共役リノール酸に変換される。



牧野ら[29]より抜粋

Fig. 1-9 1073R-1で発酵したヨーグルトの摂取による免疫賦活効果のメカニズム

1073R-1で発酵したヨーグルトを接種することにより、多糖体EPSが取り込まれ、樹状細胞が活性化する。活性化した樹状細胞はその情報をT細胞に伝えたり、NK細胞からのIFN- γ 産生を促進したりすることで、最終的にNK活性を上昇させることで風邪などに対する抵抗力が上昇すると予想される。



*2013年の生産量を100とし、算出した。

日本菓子協会 HP より作成 [29]

Fig. 1-10 日本の菓子推定生産数量

Table 1-1 A型/B型/C型インフルエンザウイルスの構造

	RNA分節	(HA,NA) の種類	亜型の有無
A型	8 HA,NA,PA,PB1, PB2,M,NP,NS	(16,9)	有
B型	8 HA,NA,PA,PB1, PB2,M,NP,NS	(1,1)	無
C型	7 HE,PA,PB1, PB2,M,NP,NS	HA,NAなし	無

Table 1-2 植物抽出物（50%エタノール抽出物）のインフルエンザウイルス A 型（A/Udorn/307/72）および B 型（B/Johannesburg/5/99）に対する感染阻害効果

植物名	学名	収率 (%)	50%感染抑制濃度 (µg/ml)	
			A/Udorn/307/72 (H3N2)	B/Johannesburg /5/99
オレンジ 葉	<i>Citrus spp.</i>	23.3	0.5	0.5
キャットクロー 樹皮	<i>Uncaria tomentosa</i>	17.0	0.5	0.5
バイベリー 樹皮	<i>Myrica cerifera</i>	27.9	0.5	0.5
ルー 全草	<i>Ruta graveolens</i>	17.8	5	0.5
エファースティング 花	<i>Helichrysum italicum</i>	24.7	5	5
リンデン 花	<i>Tilia cordata</i>	16.2	5	5
オールスパイス 種子	<i>Pimenta officinalis</i>	12.6	5	5
カカオ 種子(ロースト)	<i>Theobroma cacao</i>	12.5	50	50
カリン 実	<i>Chaenomeles sinensis</i>	31.7	0.5	0.5

インフルエンザウイルス A 型（A/Udorn/307/72）もしくは B 型（B/Johannesburg/5/99）と植物 50%エタノール抽出物を室温 1 時間反応させた後、Mardin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞に加え、34°C 3 日間培養した。抽出物未処理ウイルスから生じたプラーク数との比較により、50%感染を阻害した濃度を示した。表中の収率は、乾燥植物より 50%エタノールで抽出した際の収率を示している。

第 2 章

カリン抽出物の抗インフルエンザウイルス活性

2-1 序

植物は、様々な二次代謝産物を産生しており、これらは外敵に対する防衛策としての役割も果たしている。一方、これら植物の二次代謝産物は、ヒト感染症に有効な薬剤の潜在的な供給源として注目を集めている。本章の研究対象であるインフルエンザウイルス感染阻害効果を有する植物由来成分についてもいくつか報告されている[37][38]。

我々は、感染阻害効果が高く、安全性にも問題のない、日常的に利用できる機能性食品の開発を目的として、126種の生薬・ハーブ抽出物を対象にスクリーニングを実施し、9種の有効な素材を見出している(Table 1-2)。本章では、その中の一つであり、食経験が豊富かつ古来より喉の炎症などに有効な果実として知られているカリンに着目した。

カリンは、日本と中国を中心に広く分布しており、果実部は伝承的に気管支系の感染症に対して治癒効果があることで知られている。本研究と同時期に、Hamauzuら[39]はカリンのポリフェノール含有画分にインフルエンザウイルスの赤血球凝集を阻害する活性があることを示しており、感染の第一段階、すなわち宿主細胞上の受容体へのインフルエンザウイルスの結合を阻害することが示唆されている。

Citrus junos 由来のフラバノン配糖体など、植物由来の様々なポリフェノールについてインフルエンザウイルス感染阻害効果が報告されている[40][41][42]。Nakayamaら[41]の研究により、緑茶由来のエピガロカテキンガレート(0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$)及び紅茶由来のテアフラビンジガラート(1.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を用いて60分間、インフルエンザウイルス A/Yamagata/120/86(H1N1) や B/USSR/100/83 を処理すると、そのプラーク形成能がほぼ完全に失われることが報告されている。

大澤ら[11]はカリンに高分子ポリフェノールが含まれることを報告しており、抗炎症作用があることを示している。本研究はカリンの抗インフルエンザウイルス活性は高分子ポリフェノールによるものだと仮説をたて、活性成分の精製を実施し、各画分の感染阻害効果を確認した。さらに、マウスを用いて、カリン抽出物の抗インフルエンザウイルス活性を確認した。

2-2 材料と方法

2-2-1 細胞株およびウイルス

細胞は MDCK 細胞を用いて、10%ウシ胎仔血清を含む Eagle' s minimum essential medium (MEM) で培養した。MDCK 細胞は、Gaush ら[43]によってインフルエンザウイルスに対する感受性が報告され、続いて飛田ら[44]によりインフルエンザウイルス分離に MDCK 細胞が有用であることが明らかにされて以来、インフルエンザウイルスの研究において広く利用されている細胞であり、本研究でも使用した。

インフルエンザウイルスは、A/Udorn/307/72(H3N2) 及び A/Chiba/1001/2009(H1N1)pdm、B/Johannesburg/5/99、A/PR/8/34 (H1N1)、A/Chiba/1001/2009(H1N1)pdm を用いた。A/Udorn/307/72(H3N2) および B/Johannesburg/5/99、A/PR/8/34 (H1N1) は、Shimizu ら[45]の方法により発育鶏卵(10日卵)漿尿膜腔内もしくは MDCK 細胞内で増殖させた。A/Chiba/1001/2009(H1N1)pdm は MDCK 細胞に接種し、炭酸ガス培養器(37℃, 5%CO₂) 内で2日間増殖させた。5,000 rpm で5分間遠心しその上清液をウイルス液とした (Fig. 2-1)。

2-2-2 カリンの抽出および各分画物のポリフェノール量測定

カリンの乾燥物は、中国湖北省の市場から入手した。乾燥果実 100 g を

50% (v/v) エタノール 700 ml で 1 時間還流加熱抽出を行い、エタノールを蒸発後、残った抽出物を凍結乾燥して、27 g の赤褐色の抽出物を得た (CSE50)。Diaion HP20 (8×15 cm; 三菱化学株式会社) を用いて、50% エタノール抽出物 (CSE50) を 5 段階エタノール水勾配 (0%、20%、40%、60% および 80%) によりカラム分画を行い、5 つの画分、CSD1 (水溶出画分: 19.7 g)、CSD2 (20% エタノール溶出画分: 2.6 g)、CSD3 (40% エタノール溶出画分: 4.6 g)、CSD4 (60% エタノール溶出画分: 216 mg) および CSD5 (80% エタノール溶出画分: 81 mg) を得た (Fig. 2-2)。各画分のポリフェノール含有量は、Folin-Ciocalteu 法で測定した [46]。ポリフェノール平均分子量については、大澤ら [11] の方法に従い、算出した。即ち、まず試料 20 mg と無水ピリジン 2 ml、無水酢酸 2 ml を混合し、16 時間室温反応後、水 10 ml を加え反応物を析出させ、水により数回洗浄することでアセチル化物を得た。得られた試料は THF で溶解し、ゲル濾過クロマトグラフィーにて分析 (カラム: Shodex GPCA-803, 8×500 mm) し、算出した。また、CSD3 を toluene α -thiol 存在下で酸分解し、分解生成物の HPLC 分析を行うことにより構成成分の分析を行った。

2-2-3 感染中和効果確認試験

カリン抽出物のインフルエンザウイルスに対する感染阻害効果については、感染中和効果確認試験を実施することにより評価した。評価試料としては、2-2-2 で抽出及び精製した試料の他、Osawa ら [10][11][12] がカリン中の成分として見出したオレアノール酸、ポモリック酸、ウバオール酸、2-オキソポモール酸、 β -シトステロール、プロトカテク酸、クロロゲン酸についても評価を実施した。各試料を TGS (Tris-Glucose-Saline: 24.8 mM Tris, 136.9 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 0.2 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 5.6 mM glucose, pH 7.4) で 10 倍段階希釈 (100 μ g/ml ~ 1 ng/ml) し、希釈した試料と TGS に

懸濁したインフルエンザウイルス（約 1,000 PFU/ml）を 1 : 1 に混合し、1 時間反応させた。インフルエンザウイルスは温度が高くなると生存率が下がるため[47]、反応は室温にて行った。反応液 0.1 ml(約 50 PFU のウイルスを含む)を、6 ウェルプレートに培養した MDCK 細胞に加えた後、室温放置しウイルスを細胞に吸着させた。1 時間後トリプシン(2.5 µg/ml)を含む 0.6% L-15 アガロース培地 2 ml を各ウェルに加え、室温放置により固化させた。その後 34 °C で 3 日間培養し、生じたプラークを計数した。抽出物未処理のウイルスから生じたプラーク数との比較により以下の式によりプラーク阻害率を算出した(Fig. 2-3)。

$$100 \times (1 - \text{抽出物処理ウイルスプラーク数} / \text{未処理ウイルスプラーク数})$$

50%以上の阻害を示した最小濃度をその抽出物の感染中和濃度とした。

新型インフルエンザウイルス A/Chiba/1001/2009(H1N1)pdm については、0.1 ml のウイルス液 (2×10^7 PFU/ml) に等量の CSD3 液 (0 : コントロール、0.1 ~ 500) を加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、上記同様の方法でプラーク阻害率を算出した。

2-2-4 動物を用いた感染実験

マウスを用いたインフルエンザウイルス感染実験には A/PR/8/34 に対する感受性がある C57BL/6-J (6 週齢) マウス (n=4) を用いた。本実験は「日本大学における動物実験運営内規」に従って実験を実施した。

(1) 抽出物処理ウイルスによるマウス感染実験

カリン抽出物 CSE50 (100 µg/ml) または 0.5%エタノールとインフルエンザウイルス (4×10^4 pfu/ml または 4×10^3 PFU/ml) を 1 : 1 に混合し (い

れも TGS で希釈調製)、室温 1 時間反応させた。この抽出物処理ウイルス 50 μl (10^3 PFU または 10^2 PFU のウイルスを含む) を、エーテル麻酔下のマウスに経鼻接種後、2 週間の生死及び体重変動を観察した。

(2) 未処理ウイルス感染後のマウスへの抽出物投与

TGS に懸濁したインフルエンザウイルス 50 μl (10^3 PFU または 10^2 PFU を含む) をエーテル麻酔下のマウスに経鼻接種した。24 時間後、再度マウスをエーテル麻酔し、カリン抽出物 CSE50 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) または 0.5 %エタノール-TGS を 50 μl 経鼻投与した。感染後 2 週間の生死及び体重変動を観察した。

(3) 抽出物投与マウスへのウイルス感染

カリン抽出物 CSE50 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) をエーテル麻酔下のマウスに経鼻投与した。4 時間後、再度マウスをエーテル麻酔し、インフルエンザウイルス 50 μl (10^3 PFU または 10^2 PFU を含む) を経鼻接種した。感染後 2 週間の生死及び体重変動を観察した (Fig. 2-4)。

2-2-5 データ処理

感染中和効果確認試験のデータはポアソン分布、その他の結果については正規分布に従うと仮定して平均値±標準偏差で表した。

2-3 結果

2-3-1 インフルエンザウイルスに対する感染阻害効果

カリン抽出物 CSE50 のインフルエンザウイルスに対する感染阻害効果を確認するために、CSE50 で室温 1 時間処理をしたインフルエンザウイルス A 型 (A/Udorn/307/72) を用いて評価した。その結果、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のカリン

抽出物 CSE50 で処理すると、未処理時と比較して、感染価が 10%以下に低下した (Table 2-1)。続いてインフルエンザウイルス B 型 (B/Johannesburg/5/99) に対する抗インフルエンザウイルス効果を検証したところ、A 型同様、5 $\mu\text{g/ml}$ 以上のカリン抽出物 CSE50 で感染価が 10%以下まで低下した。それぞれのインフルエンザウイルス 50%感染阻害濃度を算出したところ、A/Udorn/307/72 は $1.6 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$ 、B/Johannesburg/5/99 は $1.4 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ であった。

カリン以外の植物では、緑茶 50%エタノール抽出物において抗インフルエンザウイルス活性が報告されている [41]。本研究においても、緑茶抽出物の抗インフルエンザウイルス活性を評価したところ、インフルエンザウイルス 50%感染阻害濃度は、A/Udorn/307/72 に対しては $2.7 \pm 0.7 \mu\text{g/ml}$ 、B/Johannesburg/5/99 に対しては $4.5 \pm 1.9 \mu\text{g/ml}$ であり (Table 2-1)、カリン抽出物 CSE50 の抗インフルエンザウイルス活性が、緑茶と同程度であることが示唆された。

2-3-2 活性成分の精製

Osawa ら [10][11][12]により、カリン中の成分としてオレアノール酸、ポモリック酸、2-オキシポモリック酸、ウバオール、 β -シトステロール、プロトカテキ酸、クロロゲン酸が含まれており、これらは抗菌性や抗溶血活性などの生理活性を持っていることが報告されている。そこで、本研究においても、これらの成分についてインフルエンザウイルスに対する感染阻害効果を検証したが、最も高い阻害活性でも 30%程度であり、顕著に高い阻害活性を示す成分は見出されなかった (Table 2-2)。

そこで続いて、感染阻害活性を指標として活性成分の精製を行った。カリン抽出物 CSE50 (27 g) をエタノール-水系で Diaion HP20 によりカラム分画

し、CSD1~5の画分を得た。各画分の抗インフルエンザウイルス活性については、A/Udorn/307/72を用いた感染中和効果確認試験により評価した。各画分のインフルエンザウイルス50%感染阻害濃度は、Table 2-3に示した。最も効果が高かった画分はCSD3(40%エタノール溶出画分)であり、0.2 µg/mlであった。また、各画分のポリフェノール含有量を測定したところ、CSD3が最も高く61%であった(Table 2-3)。CSD3のアセチル化物を調製し、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて、CSD3中のポリフェノールの平均分子量を算出したところ、6,100であり(Fig. 2-5)、高分子ポリフェノールで構成されていることが示唆された。また、CSD3をtoluene- α -thiol存在下で酸分解し、分解生成物のHPLC分析を行ったところ、epicatechin-4 β -benzyl thioetherが主な構成物質であった(Fig. 2-6)ことから、CSD3はエピカテキン主体の高分子ポリフェノールを多く含む画分であることが確認できた。

2-3-4 新型インフルエンザウイルスに対する感染阻害効果

続いて、新型インフルエンザウイルス(A/Chiba/1001/2009(H1N1)pdm)に対する感染阻害効果を評価した。未処理ウイルスの感染価は 1.0×10^7 PFU/mlであった。評価にはTable 2-3で最もインフルエンザウイルス50%感染阻害濃度が低かったCSD3を用いて評価した。CSD3の処理により、用量依存的に感染阻害効果が確認され、1 µg/mlでは約2/3、25 µg/mlでは約1/60、250 µg/mlでは約1/10,000に感染価が減少し(Fig. 2-7)、新型インフルエンザウイルスに対する効果についても確認された。

2-3-5 カリン抽出物 CSE50 のマウスにおけるインフルエンザウイルスに対する感染阻害効果

培養細胞を用いた系においてカリン抽出物 CSE50 が抗インフルエンザウ

ウイルス活性を持つことが明らかになった。この抗ウイルス効果が生体内においても観察されるか検討するために、マウスを用いて感染実験を行った。1,000 pfu または 100 pfu のウイルス (A/PR/8/34) を接種したところ全頭死亡したが、カリン抽出物 CSE50 でウイルスを前処理後投与すると、マウスは全頭生存することが確認された (Fig. 2-8A)。続いて、カリン抽出物 CSE50 のインフルエンザウイルス感染予防効果および治療効果を検討した。抽出物投与後にウイルスを接種した場合 (Fig. 2-8B)、また、ウイルス接種後に抽出物を投与した場合 (Fig. 2-8C)、どちらの投与条件においても、抗インフルエンザウイルス効果は確認されなかった。

2-4 考察

インフルエンザは、時折パンデミックと呼ばれる世界的大流行を引き起こす。2009年3月には、メキシコを発端として H1N1 新型インフルエンザウイルスが猛威をふるい、世界を震撼させた。過去のインフルエンザウイルスの検出状況からその年に流行する亜型を予測しワクチンを作成しているため、予測外の変異をおこしたインフルエンザウイルスが流行すると、上記のようなパンデミックを生じることとなる。A 型インフルエンザウイルスは第 1 章で述べたように毎年のように変異を起こすため、亜型の変化にも耐えうる有効な手段が求められている。

本章では、カリンのインフルエンザウイルスに対する感染阻害効果について H1N1 新型ウイルスを含む型違いのウイルスを用いて評価した。その結果、カリンの 50%エタノール抽出物 (CSE50) はウイルスの型に関係なく感染阻害効果が確認された。その効果は、すでに報告されている緑茶 50%エタノール抽出物 [41] と同程度の効果であることが示唆されたが、厳密に比較検討するためには、評価測点を増やす必要があると考える。

続いて、インフルエンザウイルス感染阻害効果を有する成分の同定を試みたところ、高い活性を示した画分の主成分はエピカテキン主体の高分子ポリフェノールであることが確認できた。植物ポリフェノール類のインフルエンザウイルス感染阻害効果はすでに報告されており[40][41][42]、カリン抽出物においてもポリフェノール類が活性成分であることが示唆された。

培養細胞においてカリン抽出物 CSE50 のインフルエンザウイルスに対する感染阻害効果が確認できたため、次に、マウスにおける感染阻害効果を評価したところ、カリン抽出物 CSE50 で前処理したウイルスを感染させたマウスのみ生存が確認された。このことは、カリン抽出物 CSE50 の抗ウイルス効果が生体内においても有効であることを明確に示している。一方で、①カリン抽出物 CSE50 を投与後、ウイルスを感染させた場合（予防効果）及び②ウイルスを感染させた後、カリン抽出物 CSE50 を投与した場合（治療効果）のいずれにおいても効果が消失した。このことからカリン抽出物 CSE50 中の抗ウイルス物質が体内で不安定であるか、あるいは投与後速やかに排除されるのか、あるいは、カリン抽出物 CSE50 がウイルスに近接することが必須であることなどが示唆される。ただし、抽出物投与条件（投与量、投与時期）の詳細な検討により、インフルエンザウイルス感染に対してより強い予防効果もしくは治療効果を示し得る可能性を否定するものではない。

2-5 結論

カリン抽出物は、インフルエンザウイルス 3 株 (A/Udorn/307/72、A/Chiba/1001/2009(H1N1)pdm、B/Johannesburg/5/99) に対して、感染阻害効果を示し、ウイルスの型が異なっても有効である可能性を示した。また、マウスを用いた実験により、カリン抽出物とインフルエンザウイルスが近接することで効果が発揮できることが示唆された。その活性画分を分析したところ、

エピカテキン主体の高分子ポリフェノールを多く含む画分であることが確認され、ポリフェノールが活性成分である可能性が高いことが示唆された。

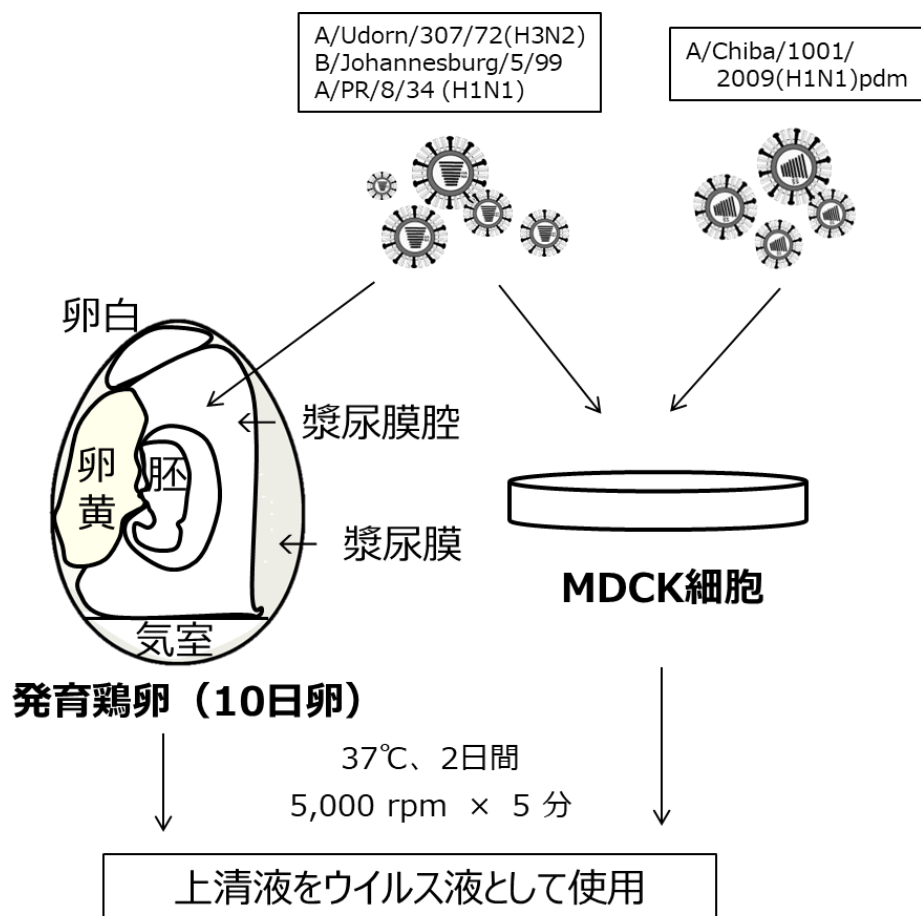


Fig. 2-1 本研究におけるインフルエンザウイルスの調製法

ウイルスは、Shimizu *et al.* [45]の方法に従い、発育鶏卵（10日卵）漿尿膜腔内もしくはMDCK細胞内で増殖させた。

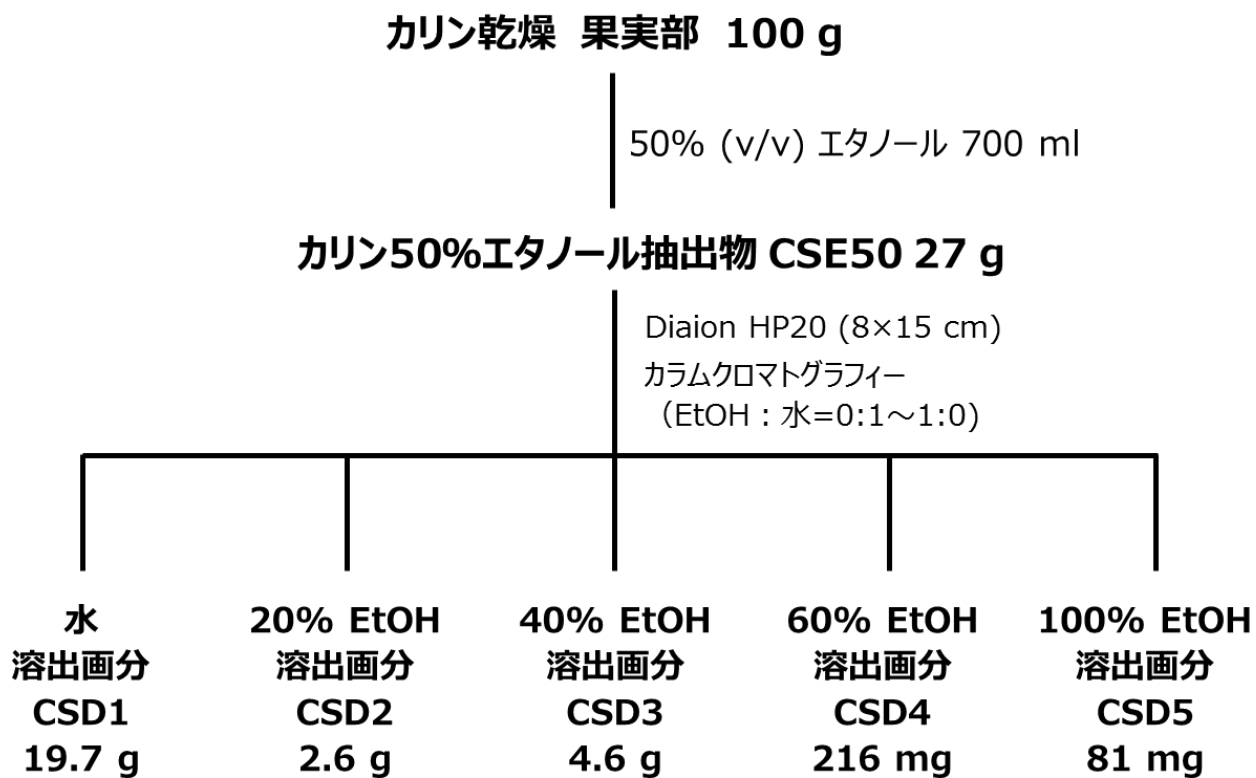


Fig. 2-2 カリンの抽出および精製

カリンドライ果実を 50% (v/v) エタノールで 1 時間還流加熱抽出を行い、エタノールを蒸発後、残った抽出物を凍結乾燥して、CSE50 を得た。Diaion HP20 を用いて、CSE50 を 5 段階エタノール水勾配によりカラム分画を行い、CSD1 ~ CSD5 の 5 つの画分を得た。

インフルエンザウイルス (1000 pfu/ml) :抽出物 = 1:1

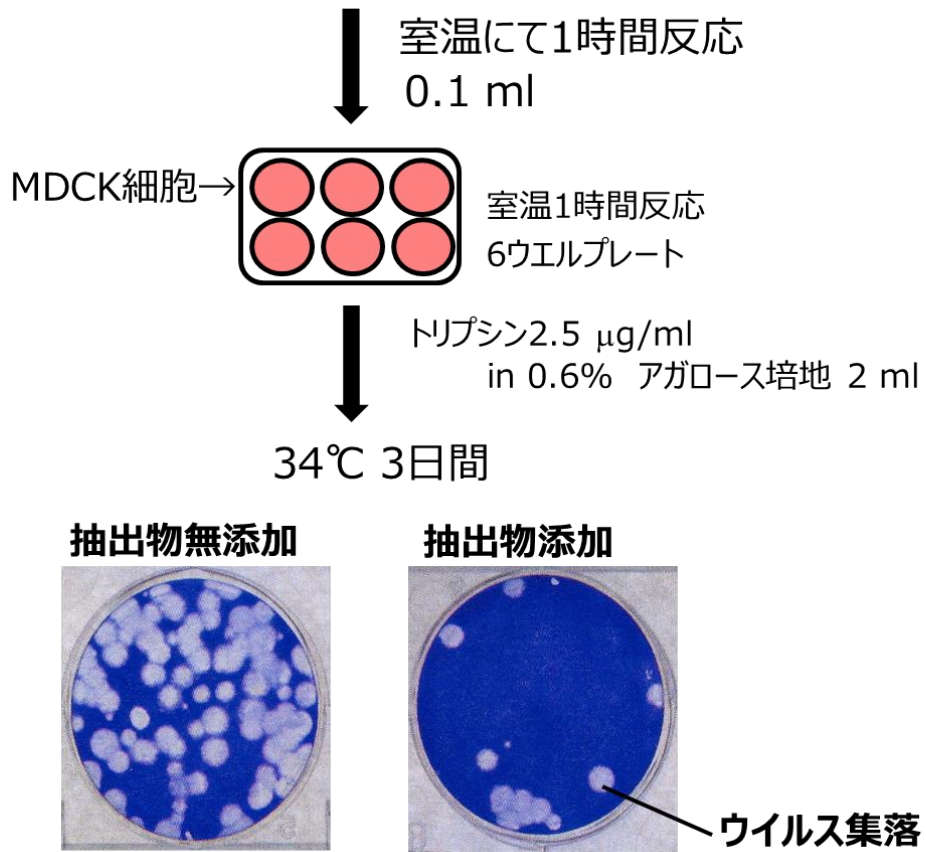


Fig. 2-3 感染中和効果確認試験

感染中和効果確認試験は、上記の方法で実施した。抽出物無添加で生じたプラーク数との比較により、以下の式によりプラーク阻害率を算出した。

$$100 \times (1 - \text{抽出物処理ウイルスプラーク数} / \text{未処理ウイルスプラーク数})$$

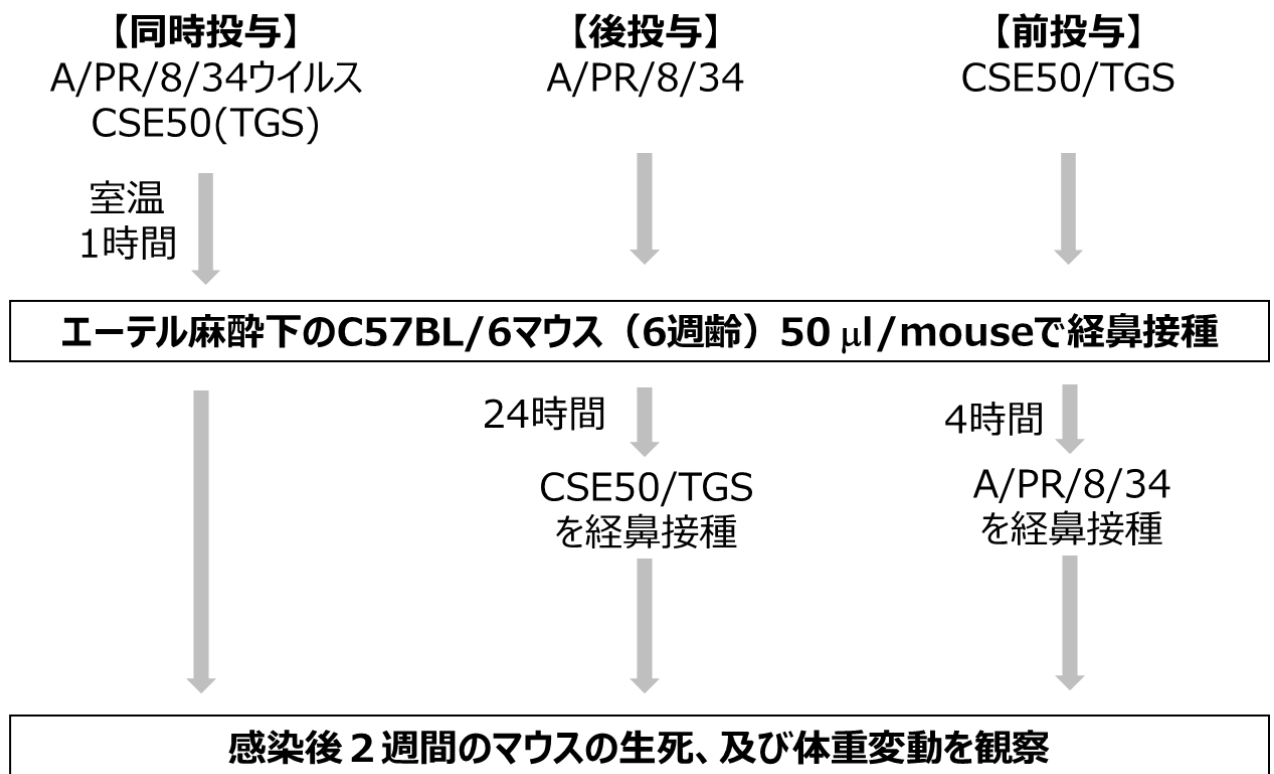


Fig. 2-4 マウスを用いたインフルエンザウイルス感染実験の方法

マウス（n=4）を用いた感染実験では、A/PR8/34 ウイルスを用いて上図の通り実施した。

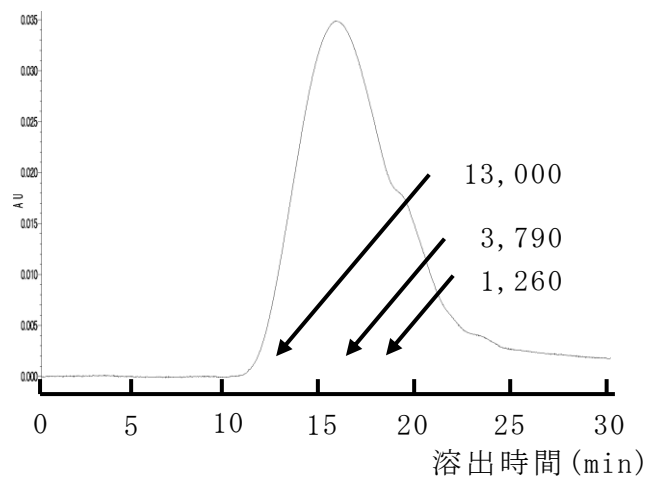


Fig. 2-5 CSD3 アセチル化物の GPC 分析

大澤ら[11]の方法に従って、アセチル化物を調製し、ゲルろ過クロマトグラフィー分析を実施し、基準物質（ポリスチレン、分子量：13,000、3,790、1,260）をもとに平均分子量を算出した。

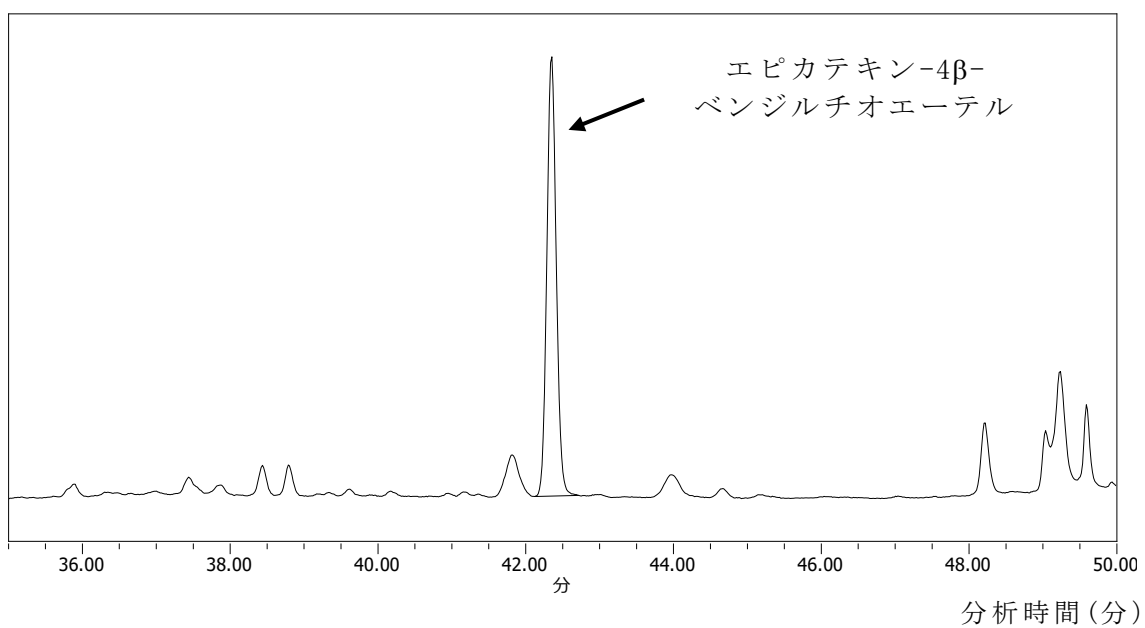
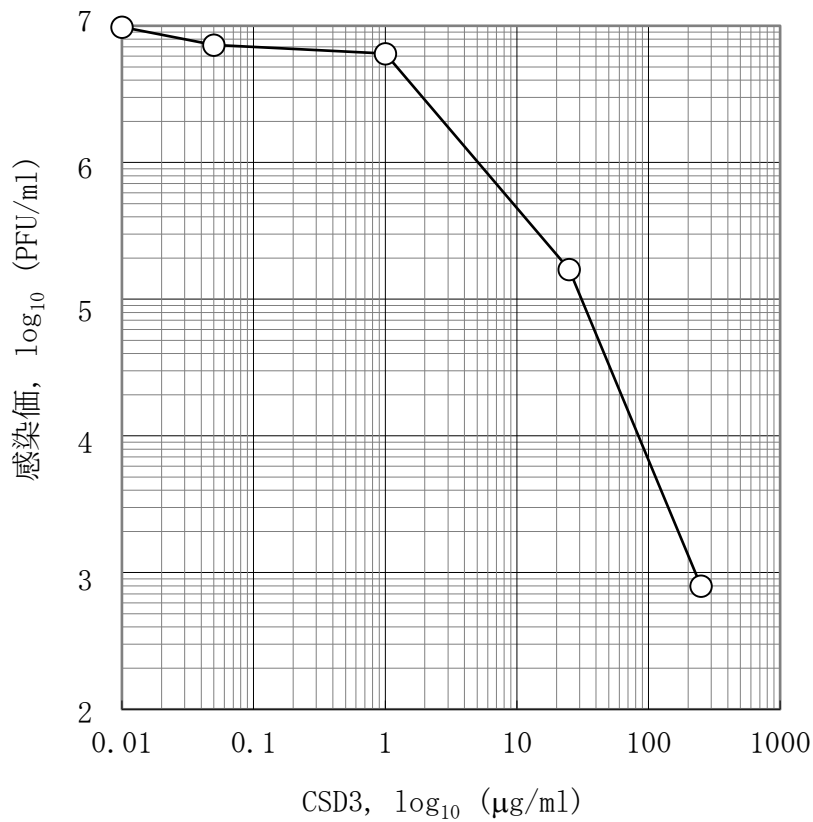


Fig. 2-6 CSD3 チオール分解物の HPLC 分析



黒田（澤井）ら[48]

Fig. 2-7 CSD3 の A/Chiba/1001/2009(H1N1)pdm に対する感染中和効果

新型インフルエンザウイルス (A/Chiba/1001/2009(H1N1)pdm) に対する感染中和活性を、プラーク感染価減少試験により評価した。未処理ウイルスの感染価は 1.0×10^7 PFU/ml であったのに対し、CSD3 処理により、用量依存的に感染阻害効果が確認された。

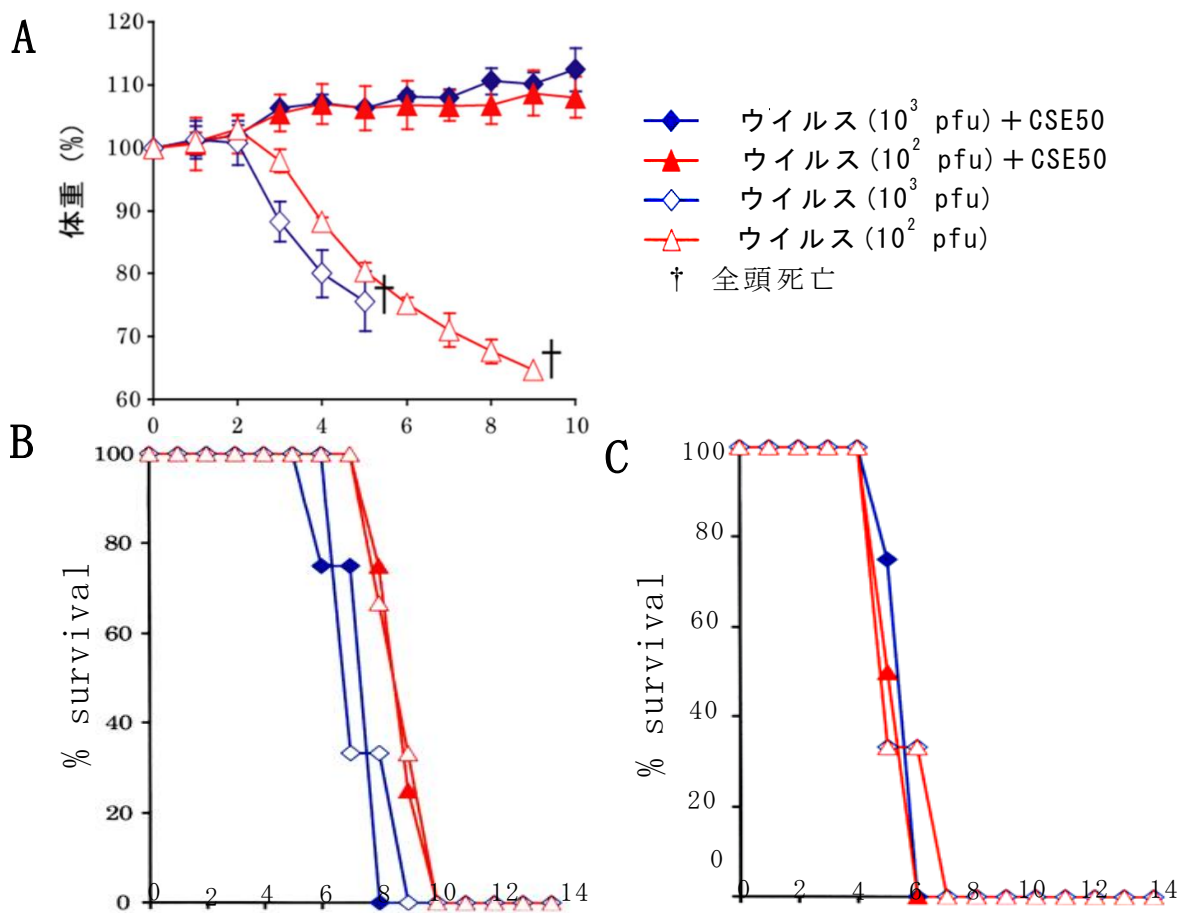


Fig. 2-8 マウスにおけるカリン抽出物 CSE50 の抗インフルエンザウイルス活性

動物実験には、マウス馴化株であり、マウスに対する致死性が高い A/PR/8/34 (H1N1) を用いて、以下のように摂取タイミングを変えて CSE50 およびウイルスを投与し、2 週間生死又は体重変動を観察した。

A CSE50 で前処理したウイルスを接種した場合

CSE50 とインフルエンザウイルスを室温 1 時間反応させた後マウスに経鼻接種した。開始時の体重を 100% として算出した。

B CSE50 を投与後、ウイルスを感染させた場合

CSE50 をマウスに経鼻接種し、4 時間後、インフルエンザウイルスを経鼻接種した。生存率 (%) で評価した。

C ウイルス感染後、CSE50 を投与した場合

インフルエンザウイルスをマウスに経鼻接種し、24 時間後、CSE50 を投与した。生存率 (%) で評価した。

Table 2-1 インフルエンザウイルス A 型および B 型に対するカリン抽出物
および緑茶抽出物の感染中和効果

濃度 μg/ml	%プラーク抑制率			
	カリン抽出物 (CSE50)		緑茶抽出物	
	IFA ^a	IFB ^b	IFA ^a	IFB ^b
0.0	0.0 ± 10.0	0.0 ± 8.2	0.0 ± 4.5	0.0 ± 16.4
0.5	-1.0 ± 10.1	38.1 ± 6.5	30.6 ± 7.6	23.8 ± 14.4
1.3	45.5 ± 7.4	- ^c	- ^c	- ^c
5.0	90.9 ± 3.3	94.6 ± 2.1	69.8 ± 5.0	52.4 ± 11.4
50	100	100	91.1 ± 2.8	98.6 ± 2.8

^a A/Udorn/307/72

^b B/Johannesburg/5/99

^c Not determined

Table 2-2 インフルエンザウイルス A 型に対するカリン中成分の感染中和効果

	%プラーク抑制率		
	Concentration of extracts ($\mu\text{g/ml}$)		
	5	0.5	0.05
オレアノール酸	30.1	3	9.2
ポモリック酸	9.8	0	-4.6
ウバオール	-6.6	4.5	7.7
2オキソポモリック酸	21.3	6.1	1.5
β -シトステロール	-9.8	18.2	9.2
プロトカテク酸	8.2	6.1	4.6
クロロゲン酸	-13.1	12.1	31.0

カリン中に含まれる成分として既に報告のあった成分について、感染中和効果を評価したが、最も高い阻害活性でも 30%程度であることが確認できた。

Table 2-3 カリン抽出物およびその分画物のポリフェノール濃度と
抗インフルエンザウイルス活性

画分	乾燥重量 (g)	IC ₅₀ (μg/ml) ^a	ポリフェノール濃度 (%)
CSE50	26.9	1.7	13
CSD1	19.7	4.6	1
CSD2	2.6	0.4	40
CSD3	4.6	0.2	61
CSD4	0.2	0.4	10
CSD5	0.08	6.6	- ^b

^a A/Udorn/307/72 に対する 50% 感染阻害濃度

^b 検出限界以下

表中の乾燥重量は、カリン乾燥果実 100 g から抽出もしくは分画、乾燥後の重量を示す。

第 3 章
カリン抽出物による
インフルエンザウイルス感染阻害機構の解明

3-1 序

第 2 章において、カリン抽出物はインフルエンザウイルスの型に依存することなく、インフルエンザウイルス A 型および B 型の両型に対して感染阻害効果を有することを確認した。カリン中の活性成分の精製を目的として分画したところ、最もインフルエンザウイルスに対する活性が高かった画分にエピカテキンを主体とする高分子ポリフェノールが 61%含有されていることが明らかになった。

インフルエンザウイルスの感染は、Fig. 1-4 に示すように、細胞への吸着、エンドソーム内での膜融合、感染細胞核内でのウイルス mRNA とゲノム RNA の合成、細胞質でのウイルスタンパク質合成、そして、感染細胞膜上での出芽によるウイルス粒子の形成・放出と、段階的に進行していく。詳細を以下に記す。

インフルエンザウイルスの感染は、ヒトの咽頭部などの上皮細胞表面に発現しているシアル酸残基をもつ糖タンパク質に、ウイルスのヘマグルチニン (HA) が結合し、吸着することでスタートする。HA の働きにより吸着したウイルスは、宿主細胞側の働きであるエンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれる (侵入)。インフルエンザウイルス感染過程の最初の段階である吸着以降膜融合までの反応 (ウイルスの侵入過程) は、吸着からほぼ 1 時間以内に終了することが分かっている [49]。HA は宿主細胞側の気道に存在するクララ細胞から分泌されるトリプシン様のタンパク質分解酵素などにより切断され、HA の開裂がおきる。HA が開裂するとその立体構造が崩れて、インフルエンザウイルスと宿主細胞の膜が融合し、ウイルスゲノムが細胞質内に放出される (膜融合・脱殻)。インフルエンザウイルス A 型ではゲノムが

8本に分節されており、11種のタンパク質をコードしていることが報告されている[50]。ウイルスゲノムは、ウイルス RNA ポリメラーゼ (PB1, PB2, PA) 複合体とヌクレオプロテイン (NP) からなるウイルスリボ核タンパク質 (vRNPs) を形成し、核内へ移行する。ウイルスゲノム (vRNA) は、マイナス鎖の一本鎖 RNA であり、ウイルスタンパク質を産生するには、翻訳のために必要なプラス鎖 RNA (mRNA) に転写する必要がある。ウイルスポリメラーゼは宿主の mRNA 前駆体のキャップ構造を認識し[51]、10 数塩基下流を切断することができる。このキャップ構造を含む RNA 断片をプライマーとして、mRNA の転写が開始される。伸長後、vRNA の 5' 末端部のウラシル残基が連続している領域を繰り返し転写することにより、約 20~30 塩基のポリ A 鎖が 3' 末端に添加され、ウイルスタンパク質を翻訳できる mRNA が作製される (一次転写、Fig. 3-1 参照、[52][53])。ゲノムの複製は、まずプライマー非依存的に vRNA を鋳型として complementary RNA (cRNA) が合成され、その cRNA を鋳型として子孫ウイルスの vRNA が合成される。ゲノム複製及び二次転写 (新しく合成された vRNA を鋳型として mRNA が転写されること) は、一次転写により新しく合成されたウイルスタンパク質が核内へ移行した後に開始する [53]。vRNP と複合体を形成した 8 セグメントの vRNA で構成されたウイルス RNA ゲノムは、細胞質内へ輸送され、細胞表面にてウイルス粒子にパッケージングされる。子孫ウイルス粒子は宿主細胞の脂質二重膜を破り、細胞外へ放出される (出芽)。抗インフルエンザウイルス活性を示す物質は、これらの過程のどこかを阻害すると考えられる (Fig. 1-4)。

本章では、カリン抽出物がインフルエンザウイルス増殖過程のどの過程において阻害活性を示すのかを明らかにすることを目的として、吸着したウイ

ルス量、HA 活性、溶血活性について評価を行った。また、カリン抽出物で処理したウイルスを感染させた MDCK 細胞を用いて RT-PCR により、mRNA、cRNA、vRNA の合成量を経時的に評価した。更に、電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察により上記の現象を検証し、抗インフルエンザウイルス活性の作用機構を解明した。

3-2 材料と方法

3-2-1 細胞株およびウイルス

細胞は 2-2-1 で述べたように、MDCK 細胞を用いて 10% ウシ胎仔血清を含む MEM で培養した。Shimizu らの方法によりインフルエンザウイルスは A/Udorn/307/72(H3N2) を発育鶏卵（11 日卵）漿尿膜腔内で増殖させた [45]。

3-2-2 カリン抽出物の調製と分析

CSE50（カリン 50%エタノール抽出物）および CSD3（CSE50 を Diaion HP20 カラムを用いて精製した抗インフルエンザウイルス活性画分）は前章に従って用意した。CSD3 のポリフェノール含有量は Folin-Ciocalteu 法による測定 [46] を実施したところ、63% (w/w) であった。これらのポリフェノール分子量を検討するため、大澤らの方法 [10] に従って、アセチル化物を調製しゲル濾過クロマトグラフィー分析を行ったところ、平均分子量は 5,330 であった (Fig. 3-2)。CSD3 (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) はエタノールを含む TGS で段階希釈して（最終エタノール濃度：0.5%）使用した。エタノール存在による試験への影響を確認したところ、本章で使用した 0.25% までは、ウイルスの赤血球凝集活性、溶血活性、感染価及び MDCK 細胞に影響を与えないことを確認した。電子顕微鏡には 0.5% エタノール（最終濃度：0.25% エタノール）を含む TGS で試料

を処理した。

3-2-3 感染中和効果確認試験

インフルエンザウイルスの感染価は、前章に従って感染中和効果確認試験により評価した。ウイルス (4×10^6 pfu/ml) と TGS で希釈した CSD3 を 1 : 1 に混合し、室温で 10 分間反応させた。反応液 0.1 ml (約 2×10^5 PFU のウイルスを含む) を、6 ウェルプレートに培養した MDCK 細胞に加えた後、室温で 30 分間放置しウイルスを細胞に吸着させた後、トリプシン ($2.5 \mu\text{g/ml}$) を含む 0.6 % L-15 アガロース培地 2 ml を各ウェルに加え、室温放置により固化させた。その後 34°C で 3 日間培養し、生じたプラークを計数した。

3-2-4 Hemagglutination (HA) assay

96 ウェルマイクロプレート上で、カリン抽出物 CSE50 と CSE50 の分画物 CSD3 を PBS (リン酸緩衝食塩水) で 2 倍段階希釈 ($50 \mu\text{l}$, $n=2$) し、その後 0.5% (v/v) ニワトリ赤血球液を $50 \mu\text{l}$ 加えた。 4°C 1 時間静置後、各ウェルにおける赤血球凝集の有無を判定し、陽性を示す最高希釈倍数の平均値を HA 価とし、 2^n で示した。

3-2-5 Hemagglutination inhibition (HI) assay

96 穴プレート上でカリン抽出物 CSE50 を PBS で 2 倍ずつ段階希釈を行い ($25 \mu\text{l}$)、インフルエンザウイルス溶液 (HA 価 2^3 , $25 \mu\text{l}$) を加えて、1 時間静置した。各ウェルに 0.5% 赤血球 $50 \mu\text{l}$ を加え、1 時間 4°C にて反応さ

せ、赤血球凝集パターンを観察し、凝集が確認されたカリン抽出物 CSE50 の最小濃度を算出した。

3-2-6 Hemolysis assay

CSE50 (カリン 50%エタノール抽出物) もしくは CSD3 (CSE50 の分画物) とウイルス (100 μ l) を懸濁後、懸濁液を 10% (v/v) 鶏赤血球 (100 μ l) と混ぜて 4°C で 30 分間反応させた。反応液を遠心後、細胞を 200 μ l ABS バッファー (80 mM 酢酸ナトリウム、20 mM 酢酸、50 mM 塩化ナトリウム、pH5.3) に懸濁し、34°C で 30 分間反応させた。遠心後、上清液を吸光度 409 nm で測定することにより評価した。

3-2-7 免疫ブロット法によるウイルスタンパクの検出

カリン抽出物 CSE50 でウイルスを処理した場合のウイルスタンパク質合成段階以降への影響を確認するため、カリン抽出物 CSE50 の添加時期を下記の 3 パターンで行った。

(1) 全過程においてカリン抽出物 CSE50 が存在する場合のウイルス増殖過程への影響

カリン 50%エタノール抽出物 CSE50 とインフルエンザウイルス (ウイルス : A/Udorn/307/72、約 1.5×10^7 PFU) 0.5 ml を室温で 1 時間反応させた。反応後 6 ウェルプレートに培養した MDCK 細胞 (1.5×10^6 個/ウェル) に播種、室温で 1 時間放置し、細胞に吸着させた。カリン抽出物と未吸着ウイルスを除去するために TGS で細胞を 3 度洗浄し、再度カリン抽出物 CSE50 を含む MEM 2 ml を添加し、5% CO₂ インキュベーターにて 34°C で培養した。

(2) 吸着段階前のみカリン抽出物 CSE50 が存在する場合のウイルス増殖過程への影響

ウイルス吸着段階におけるカリン抽出物 CSE50 の影響が、ウイルスタンパク質合成段階にどのような影響を与えるのか確認するため、続いて、吸着段階のみカリン抽出物 CSE50 を添加し実施した。(1)と同様な方法で、カリン抽出物 CSE50 で処理したウイルスを細胞に吸着させ、1 時間後、抽出物と未吸着ウイルスを除去した後、カリン抽出物 CSE50 非存在下で MEM 2 ml を添加し、培養した。

(3) 吸着段階後のみカリン抽出物 CSE50 が存在する場合のウイルス増殖過程への影響

最後に、インフルエンザウイルスを吸着させてから、カリン抽出物 CSE50 を添加することにより、吸着まで進んだウイルスのタンパク質合成段階への影響を確認した。カリン抽出物 CSE50 の代わりに TGS を用いて上記と同様な方法でウイルスを細胞へ吸着させ、未吸着ウイルス除去後、カリン抽出物 CSE50 を含む MEM 2 ml を添加し、培養した。

(1)～(3)それぞれの方法で培養し、10 時間後、上清 100 μ l を採集した。採集した上清は、低速遠心処理により細胞断片を除いた後、HA 試験を行った。得られた HA 価を細胞上清中に放出されたウイルス（子孫ウイルス）量とし、2ndで示した。評価法の詳細については、Fig. 3-3 に示した。

MDCK 細胞中のウイルスタンパク量は免疫ブロット法により測定した。MDCK 細胞をサンプルバッファー〔0.1 M Tris-HCl (pH6.8)、4% SDS、10% β -メルカプトエタノール、10% グリセロール、BPB 適量〕0.5 ml に溶解後、95°C で 5 分間インキュベーションした。熱処理した試料は短時間超音波処理

し DNA を切断した。試料中のタンパク質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離後、Trans-Blot SD cell を用い PVDF 膜に転写した。膜上のウイルスタンパク質を、抗 Udorn ウサギ血清およびパーオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体を用い、ECL-plus 検出システムにより検出した。

3-2-8 nucleoprotein (NP) mRNA, cRNA, vRNA の定量

CSD3 の最終濃度が 0~5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように処理したウイルスを TGS で希釈し、希釈液 (0.5 ml、 4×10^6 PFU/ml) を 6 ウェルプレート中 MDCK 細胞 (2×10^6 細胞/ウェル) に播種し、緩やかに振とうさせながら室温で 30 分間反応させた。反応後、上清液を除去し、CSD3 およびトリプシンを含まない MEM 0.5 ml で 0、1、2、3、4、6、8、12 時間、 34°C 、5% CO_2 の条件下で培養した。TGS 1.6 ml で洗浄後、0.9 ml denaturing solution (4 M チオシアン酸グアニジン 25 mM クエン酸ナトリウム pH7.0, 0.1 M 2-メルカプトエタノール、0.5% *N*-ラウロイルサルコシン) で溶解され、感染細胞中のウイルスゲノム RNA をグアニジンチオシアン酸法 [54] により 25%(v/v) のエタノールで回収した。回収した RNA は RNase フリーの水 20 μl を加え、 60°C で 5 分間加熱することにより、溶解した。回収した RNA を用いて、RT-PCR 法により、インフルエンザウイルス増殖過程の各段階における CSD3 の阻害効果を解析した。

(1) インフルエンザウイルスの吸着阻害効果および vRNA 合成阻害効果

インフルエンザウイルスの各 RNA 分節の両末端には、RNA の転写や複製を調節する非翻訳領域が存在しており、8 本全てに共通な 12-13 塩基からなる領域が存在しているので、プライマーはその領域をターゲットとして作製した。vRNA に対する cDNA は、Super Script III 逆転写酵素 (Life

Technologies Japan Ltd.) および 3' 末端の 12 塩基 (分節非特異的非翻訳領域) をターゲットとしたプライマー (5' -TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAG CAA AAG CAG G-3' (T7c12)) を用いて逆転写反応により合成した (Fig. 3-4)。合成した cDNA を鋳型として、インフルエンザウイルス (A/Udorn/307/72(H3N2)) の NP 特異的なオリゴヌクレオチドプライマー (F: T7c12, R: 5' -GAT CTC AGT TGC ATT CTG GCG-3' (vNPqR3, Fig. 3-4) により PCR を行った。PCR は SYBR Premix Ex-taq polymerase II (Takara Bio inc.) を用いて、95°C 30 秒、(95°C 5 秒、64°C 34 秒) × 45 サイクルで実施した。

(2) インフルエンザウイルスの転写阻害試験

CSD3 によるウイルスの一次/二次転写阻害効果は、吸着阻害試験と同様な方法で、RT-PCR 法で解析した。回収した RNA から、Super Script III 逆転写酵素および T7T₍₁₈₎VN プライマー (5' -TAA TAC GAC TCA CTA TAG GT₍₁₈₎VN-3') を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として、プライマー (F: 5' -CCC GAT CGT GCC CTC TTT TG-3' (NP_s1464)、R: T7T₍₁₈₎VN) により PCR の増幅を行った (Fig. 3-4)。PCR は上記の NP vRNA の合成と同様な方法で実施した。

(3) インフルエンザウイルスの複製段階阻害試験

CSD3 によるウイルスの複製段階阻害効果は、吸着阻害試験と同様な方法でウイルス RNA を抽出し、5' 末端に普遍的に存在する 13 塩基をターゲットとしたプライマー (5' -TAA TAC GAC TCA CTA CTA TAG GAG TAG AAA CAA GG-3' (T7p-vRNA₁₋₁₃) 及び Super Script III を用いて RT-PCR 法で cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として、プライマー (F: NP_s1464、R: T7p-vRNA₁₋₁₃) により PCR の増幅を行った。PCR は上記の NP vRNA の合成と同様な方法で実施した。NP vRNA、mRNA、cRNA の各コピー数は、定量化されている PCR 産

物の 10 倍段階希釈液を用いて検量線により算出した。

3-2-9 電子顕微鏡によるウイルス粒子観察

インフルエンザウイルス (A/Udorn/72、 5×10^8 PFU/ml) は CSD3 (最終濃度 250 $\mu\text{g/ml}$) の存在下もしくは非存在下にて 60 分室温にて反応させた。反応液 10 μl をカーボン膜コートされた銅グリッド (STEM 100Cum、応研商事株式会社) の上に置き、2%酢酸ウラニルによるネガティブ染色法により電子顕微鏡観察を行った。

3-3 結果

3-3-1 阻害メカニズムの解析

カリンのインフルエンザウイルスに対する感染阻害メカニズムを解明することを目的として、インフルエンザウイルス A 型 (A/Udorn/307/72、H3N2) を用いて、ウイルス増殖過程のどのポイントで阻害効果を発揮しているのか解析を行った。

【細胞への吸着段階】

ウイルス感染はウイルス表面のヘマグルチニンが宿主細胞表面に出現している受容体へ結合して宿主細胞に吸着することではじまる。Hemagglutination assay (HA 活性) は、このステップを模倣してウイルスのヘマグルチニンが赤血球の受容体と結合する反応に基づいたものであり、ウイルスの受容体への結合能を評価することができる。したがって、HA 活性に対する阻害活性 (HI 活性) を評価することにより、ウイルスの宿主細胞への吸着過程における阻害効果が確認できる。まず、カリン抽出物 CSE50 自体の HA 活性を確認することを目的として、500 $\mu\text{g/ml}$ のカリン抽出物 CSE50 を 2 倍段階希釈し鶏赤血球と反応させることにより HA 活性を評価した。カリン抽出物

CSE50 の濃度が 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の時、ウイルス非存在下でも赤血球凝集が確認されたため、HI 活性試験はカリン抽出物 CSE50 が 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の濃度で評価した。カリン抽出物 CSE50 が 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の時、ウイルスが赤血球に結合する能力を阻害することが確認できた。(Table 3-1)

【膜融合段階】

ウイルスの膜融合段階に対するカリン抽出物 CSE50 の効果について評価した。ウイルスのヘマグルチニンが宿主細胞の受容体に結合すると、エンドサイトーシスの働きにより細胞内にウイルスが取り込まれる。続いてウイルスのエンベロープ膜と宿主細胞のエンドソーム膜間にて膜融合がおき、ウイルス RNA とタンパク質の複合体が細胞質に放出される。溶血は、ウイルスのヘマグルチニンが赤血球のレセプターと結合し、両者の間で、膜融合が起きることにより生じる現象であり、膜融合ステップを模倣している。A/Udorn/307/72 をカリン抽出物 CSE50 で処理し、赤血球を添加すると、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で溶血を 80%阻害することが明らかになった (Fig. 3-5)。ウイルスの吸着段階に対する阻害効果は 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で観察されたことから、溶血阻害効果は、吸着段階における阻害効果が起因しているものと思われる。

【ウイルスタンパク質合成段階】

次に、ウイルスタンパク質の合成段階に対するカリン抽出物 CSE50 の効果を評価した (Fig. 3-6)。50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のカリン抽出物 CSE50 で処理したウイルスを感染させた細胞では、吸着後カリン抽出物 CSE50 を除いて培養してもウイルスタンパク質が検出されなかった (Fig. 3-6 a 及び c)。一方、インフルエンザウイルスを吸着後、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のカリン抽出物 CSE50 を添加すると、ウイルスタンパク質は選択的に合成が阻害された。M1 タンパク質の合成は阻害されなかったが、HA タンパク質産生量は減少し、NS2 タンパク質は完全に検出されなかった (Fig. 3-6 b)。また同濃度において培養上清液中に放出

されたウイルスは検出されなかった (Table 3-2)。NS2 タンパク質の選択的な合成阻害は、12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のカリン抽出物 CSE50 を添加した場合においても観察された (Fig. 3-6 i)。同濃度の時、NS2 以外のウイルスタンパク質の合成量は、カリン抽出物 CSE50 未処理ウイルスとあまり変わらなかったが、培養上清液中に放出されたウイルスは 25% に減少していた (Table 3-2)。12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のカリン抽出物 CSE50 で処理したウイルスを吸着した後、カリン抽出物 CSE50 非存在下で培養したところ、未処理ウイルスと比較して、その培養上清液中のウイルス放出量は 50% 減少していた (Table 3-2)。

【CSD3 処理によるインフルエンザウイルスの生物学的活性への影響】

続いて、活性成分を含む画分である CSD3 を用いて、上述のウイルスタンパク質への影響が、吸着段階における阻害のみで説明ができるかどうか検証した。

MDCK 細胞を用いてインフルエンザウイルス感染性の減少を評価したところ、CSD3 濃度依存的に確認され、大きく 2 相に分かれていた (第 I 相 : 0-0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 第 II 相 : 0.5-5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、Fig. 3-7)。第 I 相 (CSD3 の濃度が 0-0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) では CSD3 未処理ウイルス時と比較して感染率は 65% に減少したが、第 II 相では、CSD3 濃度 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で感染価が 99% 減少し、5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では検出限界 (10 PFU/ml) 以下まで感染価が減少した。CSD3 濃度に対する感染減少率は、第 I 相と比較すると、第 II 相は 7 倍高かった。

従って、阻害ポイントは宿主細胞への吸着段階だけではなく、複数あると仮定し、CSD3 処理ウイルスを MDCK 細胞に感染させ、各段階の指標を測定することにより評価した。予備試験として、CSD3 処理によりウイルスの構造が破壊されウイルスゲノムに直接影響を与えているかどうか確認するため、室温に 10 分間 CSD3 で処理した (もしくは CSD3 非存在下で処理した) ウイルスの NP vRNA 量を定量することで評価した。5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の CSD3 で処理した

ウイルスにおいても、ウイルス未処理時と比較して NP vRNA の著しい減少は観察されなかったため (Fig. 3-7)、ウイルスゲノムへの直接的な影響は低いと判断した。

ウイルスの宿主細胞への結合活性は、CSD3 でウイルスを 10 分間処理させた後、30 分間室温にて MDCK 細胞に吸着させ、細胞に吸着したウイルスの NP vRNA 量を回収・定量することで評価した (Fig. 3-7)。細胞に吸着した NP vRNA のコピー数は CSD3 処理により濃度依存的に減少し、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で CSD3 非処理時と比較して 30%、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で 8% まで減少した。感染の減少率は、CSD3 濃度依存的に大きく 2 相 (第 I 相: 0-0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、第 II 相: 0.5-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) に分かれていたが、第 I 相における CSD3 の濃度での感染減少率は結合活性の減少度とほぼ一致していた。CSD3 (0-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で処理したウイルスの NP vRNA 量の減少は確認できなかったことから、ウイルスゲノムが破壊されたことが原因で生じた現象ではなく、第 I 相 (CSD3 の濃度が 0-0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) では、ウイルスの宿主細胞への吸着段階を阻害することで感染を阻害したと考えられる。

続いて、鶏の赤血球を用いて CSD3 処理ウイルスの HA および溶血活性について評価した (Fig. 3-7)。これらの活性も CSD3 濃度の第 I 相および第 II 相にわたって、吸着活性とほぼ同じ傾きを示しており、CSD3 の HA 活性および溶血活性によるウイルスの不活性化は吸着活性の低下によるものと判断され、CSE50 と同様な結果が得られた。

第 II 相 (CSD3 の濃度が 0.5-5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) においては、吸着活性は第 I 相とほぼ同じ傾きであるが、ウイルスの感染率は 1/30 程度であり、急激に減少している。このことは、第 II 相はウイルス吸着・膜融合以降の過程を阻害していることを示唆している (Fig. 3-7)。

膜融合以降のどの過程において CSD3 は影響を与えたのか検証するため、

ウイルス RNA を定量することにより評価した (Fig. 3-8)。

MDCK 細胞に 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の CSD3 で処理したウイルスもしくは未処理ウイルスを感染させ、ウイルス RNA の合成量を評価した。評価は定量的 PCR の手法を用いて、感染後経時的に 8 つの遺伝子のセグメントの一つである NP 遺伝子中の 3 種類の RNA を定量することで行った。なお、MTT(3-4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) アッセイにより、MDCK 細胞に対する CSD3 の 50%細胞毒性を評価したところ、860 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、本研究試験条件下では細胞毒性は確認されなかった。感染直後の CSD3 未処理ウイルス感染時のコピー数は 4.7×10^8 NP vRNA であるのに対し、CSD3 処理ウイルス感染時のコピー数は 1.7×10^8 NP vRNA であったことから、前述同様、細胞へ吸着したウイルス量は CSD3 処理により約 36%に減少することが明らかになった。CSD3 未処理ウイルスにおいて、NP mRNA は感染後 1 時間で増加し、2 時間で 6.9×10^6 のコピー数まで増加した。cRNA は感染後 2 時間までは増加せず、2 時間から 3 時間で増加しはじめた。一方、CSD3 処理ウイルスの場合は、感染 2 時間後において、NP mRNA は 5.1×10^4 のコピー数であり、未処理ウイルス時と比較して、100 倍以上低かった。ウイルス感染 2 時間後の mRNA 量は、一次転写の過程により産生された mRNA 量を反映されており、上記の結果は、一次転写の段階で CSD3 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加することにより 1/100 に阻害されたことを示唆する。感染 2 時間以降は二次転写の段階である。感染 2 時間後から 6 時間後におけるウイルス感染細胞中の NP mRNA の増加量は $0.75 \log_{10}$ コピー数/時間であったが、CSD3 で処理したウイルスの増加量は $0.35 \log_{10}$ コピー数/時間 (感染 2 時間から 8 時間後) であり、未処理ウイルスと比較して 2.1 倍低かった。つまり、CSD3 処理したウイルスと比較して、未処理ウイルスが感染した細胞内では、2.1 倍感染過程が速く進んでいることを示している。また、未処理ウイルスが感染した細胞においては、

感染後 8 時間まで cRNA および vRNA の合成量の増加が確認されたが、CSD3 処理ウイルスが感染した細胞においては、ほとんど増加が確認されなかった。感染 12 時間後、培養上清中に放出された感染性のあるウイルス量を定量したところ、未処理ウイルスと比較して、CSD3 処理ウイルスが感染した培養上清液では、 $3.6 \log_{10}$ コピー数分低かった (data not shown)。

3-3-2 電子顕微鏡による観察

CSD3 処理ウイルスおよび非処理ウイルスについて電子顕微鏡による観察を行った (Fig. 3-9)。インフルエンザウイルス (A/Udorn/72, 5×10^8 PFU/ml) は、Fig. 3-4 および Fig. 3-5 におけるインフルエンザウイルス粒子と CSD3 濃度の割合 (CSD3 が $1 \mu\text{g/ml}$ あたりウイルス 2×10^6 PFU/ml) と同じになるような濃度 ($250 \mu\text{g/ml}$) の CSD3 で処理した。CSD3 でウイルスを室温 1 時間処理した後、処理したウイルスを 2%酢酸ウランでネガティブ染色をすることで観察した。CSD3 で処理したウイルス粒子では、染色液が粒子内に浸透し、内部の構造が透過されていた (Fig. 3-9B および D)。一方、非処理ウイルスでは、ウイルス粒子内への浸透は確認されず、ウイルス表面のスパイク層が観察された (Fig. 3-9A および C)。これらの結果はエンベロープ膜の完全性が CSD3 処理によりダメージをうけたことを示している。加えて、CSD3 で処理したウイルス粒子は凝集している様子が観察された (Fig. 3-9 B)。ウイルスのスパイク層の厚みを数か所計測したところ、処理ウイルスのスパイク層は、非処理ウイルスのスパイク層と比較して厚みがあったことが確認できており、CSD3 がウイルスのスパイク層に結合する可能性が示唆された。

3-4 考察

本研究により、カリンの抗インフルエンザウイルス活性は大きく 2 相に分かれていることが明らかになった。第 I 相 (0-0.5 $\mu\text{g/ml}$) においてカリン分画物 CSD3 によるインフルエンザウイルス感染阻害率は、細胞結合力、HA 活性、溶血活性への阻害率と同等であった (Fig. 3-7)。HA 活性はウイルスの宿主細胞への受容体結合能を代替している。溶血活性は細胞膜とエンベロープ膜の膜融合 (酸性条件依存的活性) を評価しているものであり、前提条件として、ウイルスの細胞への結合が必要である。それゆえ、CSD3 処理ウイルスの溶血活性が減少したのは、膜融合活性が減少したことに起因しているのではなく、ウイルスの受容体結合能力、つまり、最初の感染ステップである細胞結合活性が減少したことに起因すると考えられる。電子顕微鏡による観察において、ウイルス粒子が凝集している様子が観察されており (Fig. 3-9)、CSD3 によりウイルス粒子同士が吸着することでウイルスの宿主細胞への結合能を減少させていると考えられる。前章より、カリン中の活性成分にはエピカテキン主体の高分子ポリフェノールが含まれていたことが確認されている。手塚ら [55] により、(-) - エピカテキンガラートおよび (-) - エピガロカテキンガラートは、ウイルス表面に吸着し、ウイルス同士の凝縮を引き起こすことによりウイルスの細胞への吸着を阻害することが考察されている。本研究においてもこれらのカテキン類と同様にウイルス粒子に直接結合することで吸着を阻害していると考えられる。

CSD3 濃度が 1 $\mu\text{g/ml}$ (第 II 相: 0.5 $\mu\text{g/ml}$ -) になると、未処理時と比較して処理ウイルスの感染力は 1/100 に減少している (Fig. 3-7)。CSD3 によるウイルスの細胞への吸着阻害率は同濃度において 1/3 程度にすぎないことから、この感染力低下は吸着阻害だけでは説明できない。つまり、第 II 相における主な感染阻害メカニズムはウイルス結合および膜融合後で生じ

ていると考えられる。膜融合後のウイルス増殖過程は、ウイルス mRNA とゲノム RNA の合成段階へと移る。ウイルス RNA 合成は、ウイルスのポリメラーゼ複合体による mRNA の一次転写によりスタートする。ウイルスタンパク質が一次転写で産生されたプラス鎖の mRNA をもとに合成される一方、vRNA を鋳型として cRNA が合成され、続いてそれを鋳型として子孫ウイルスの vRNA が合成されることでゲノムの複製が行われる。二次転写は新しく合成された vRNA をもとにして開始する。CSD3 の処理により、感染細胞内におけるウイルス mRNA の合成スピードは、非処理時と比較して（一次転写の段階では）1/100 に減速していることが明らかになった（Fig. 3-8）。

感染実験において、調製したインフルエンザウイルスは、その保存状態にも依存するが、感染性を有するウイルスよりも非感染性のウイルスの割合が高い。本研究において、接種したウイルスの感染価は 2.0×10^6 pfu/well であったが、非処理ウイルスの NP vRNA のコピー数は 8.0×10^8 コピー数/well 検出（Fig. 3-8）されている。つまり、感染性のウイルスと非感染性のウイルスの比は約 1:400 であると算出された。また、結果は示さないが、この実験で使用したウイルスを感染させた後、蛍光抗体法により細胞内の NP 抗原の存在を観察したところ、感染価から算定される細胞数と比較して約 80 倍多くの NP 抗原陽性細胞が確認された。以上より、非感染性のウイルスの約 20%（80/400）はウイルス mRNA、タンパク質を誘導する能力をもっており、遺伝的に活性なウイルスであると推察された。ウイルス感染に使用した MDCK 細胞数は、 2.0×10^6 cell/well だったのに対し、接種したウイルスは 2.0×10^5 PFU であり、MOI（Multiplicity of infection）は 0.1 であった。このことから、非感染性ウイルス中で遺伝的に活性のあるウイルスの MOI は 0.1 の 80 倍の 8 程度であることが予測される。CSD3（1 μ g/ml）で処理すると、膜融合段階で吸着するウイルスがカリン抽出物の処理により 1/3 程度に減少す

ることから、計算上、CSD3 処理ウイルスの MOI は 2.67 程度であったと予測される。実際は CSD3 処理ウイルスの MOI は非処理ウイルスの 100 分の 1 にあたる 0.001 程度であり、遺伝的に活性状態である MOI は 0.08 であったことから、処理により感染性はないが遺伝的には活性状態であったウイルスに対しても何らかの影響を与えたと考えられる。それ以降の過程で生じるウイルスタンパク質量、cRNA、vRNA、二次転写 mRNA の合成量も CSD3 処理ウイルスと比較して非処理ウイルスの方が多くなり、CSD3 処理したウイルスと比較して、未処理ウイルスが感染した細胞内では、2.1 倍感染過程が速く進んでいたと考えられる。

CSE50 を用いてウイルスタンパク質への影響を検証したところ、12.5 $\mu\text{g/ml}$ の CSE50 で処理すると、NS2 タンパク質の合成量が減少していた。NS2 タンパク質はインフルエンザウイルスの基本的なタンパク質であり、M1 タンパク質やリボ核タンパク質複合体とともに核外輸送複合体を形成し、細胞内の挙動に関わることが報告されている [56][57]。NS2 タンパク質は M1 タンパク質とともにウイルスに取り込まれ、ウイルス粒子を形成する役割を担うことが知られている [58][59]。カリンのポリフェノール画分のインフルエンザウイルス吸着段階に対する阻害活性については Hamauzu ら [34] により報告されたが、ウイルスタンパク質の合成段階への影響は報告されていなかった。同様な活性が、ワインなどに含まれるレスベラトロールで報告されている [60]。レスベラトロールは感染後期に発現するウイルスタンパク質の合成を阻害する。NS2 タンパク質も感染後期に発現するウイルスタンパク質であり、レスベラトロールの NS2 タンパク質への影響は言及されていなかったが、ポリフェノールの共通な性質としてウイルスタンパク質の合成を阻害していると考えられる。一方、レスベラトロールは M1 タンパク質の合成を阻害したが、カリン抽出物 CSE50 は阻害しなかったことから、二つのポリフェ

ノールは違うメカニズムでウイルスの合成を阻害していると考えられる。

電子顕微鏡による観察より、CSE50 処理によってウイルスのエンベロープ膜が傷ついており、ウラニル酢酸により内部が透過されていることが明らかになっている。この現象はカリウム抽出物のウイルス感染阻害メカニズムを解明する手がかりとなる。可能性の一つとして、エンベロープ膜の透過性が増加することにより、ウイルス粒子内部の酸性化がコントロールできなくなったことが考えられる。M2 プロトンチャンネルはエンドソーム内が酸性になると活性化され、水素イオンがウイルス粒子内部内に流入し、ウイルス粒子内部が酸性化する。M2 依存的にウイルス内部が酸性化されると、M1 タンパク質が崩壊する。M1 タンパク質は、ウイルス殻を形成しており、崩壊することで、ウイルスゲノム複合体が脱殻する [52]。エンドソーム内の酸性化は HA タンパク質を活性化し、エンベロープ膜の融合を引き起こす [61]。エンベロープ膜への浸透性が増加することによりウイルス粒子内が酸性化することは、HA 活性や細胞質へのリボ核タンパク質の放出が起これば感染力が低減することを導く。上記に関連した抗ウイルス薬がアマンタジンやリマンタジンといった M2 タンパク質のチャンネルをブロックする薬である。これらは、M2 タンパク質のチャンネルをブロックすることにより、宿主細胞内にウイルスゲノムが放出されるのを阻害している [62][63][64]。

もう一つの可能性は、CSD3 中のポリフェノール成分がウイルスのリボ核タンパク質と直接結合しており、このことが、リボ核タンパク質の核内移行や一次転写段階を阻害していると考えられる。緑茶中のエピガロカテキンガレートとウイルス RNA ポリメラーゼの PA サブユニットを用いたドッキングシミュレーションにより、エピガロカテキンガレート中のガロイル基は PA サブユニットの N 末にあるエンドヌクレアーゼの活性ポケットと結合することが明らかになっている [65] (Fig. 3-10)。緑茶カテキンが DNA や RNA 分

子に結合することも報告されている[66]。これらの報告は、浸透性が高くなったエンベロープ膜を通じて、CSD3 中のポリフェノールがウイルス粒子内部へ浸透し、リボ核タンパク質への結合や一次転写段階を阻害する可能性を示唆している。

本章において、CSD3 がインフルエンザウイルスを不活性化するメカニズムとして少なくとも二つあることが明らかになった。最初のステップは、CSD3 の濃度が 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までの第 I 相である。第 I 相では、ウイルス表面上のヘマグルチニンへ結合することにより、ウイルスの感染性が緩やかに阻害されていることが示唆された。一方、第 II 相（CSD3 の濃度が 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上）においては、ウイルスのエンベロープ膜が破壊され、結果、ウイルス侵入後の過程である一次転写の過程が阻害されることにより、ウイルスの感染性が 1/100 まで減少したのではないかと推察される。

植物中のポリフェノール（もしくはポリフェノール含有画分）による抗インフルエンザウイルス効果については、ザクロ[67]、キスツス・クレティクス[68]、緑茶[41]、マルメロ、カリン、リンゴ[39]など多数報告されている。本章で明らかになった、CSD3 のインフルエンザウイルスに対する有効濃度である 0.2-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ は非常に低濃度であり、口腔内や鼻腔内で容易に達することができる。またカリン自体はカリン酒やカリンジャム、飴などで日常的に摂取できる食品であること、またインフルエンザウイルスの感染阻害効果に加えて、カリン中の成分の鎮咳や去痰作用が報告されていることから、これら流行する冬季シーズンにおいて有望な植物となりうるかもしれない。

3-5 結論

カリン抽出物（CSD3）処理ウイルスでは一次転写より前段階でウイルス増殖が停止することが示された。カリン抽出物 0-0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度ではウイル

スの吸着・膜融合段階での失活によりウイルスの感染が 1/3 まで減少し、0.5-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では吸着・膜融合段階における阻害に加えて一次転写までの過程のいずれかの阻害によりウイルスの感染が 1/100 まで減少した。電子顕微鏡による観察より、エンベロープ膜が損傷を受けてウイルス粒子内部が透過していたことから、ウイルス粒子の構造が破壊されたことで、第 II 相における阻害活性が生じていると考えられる。

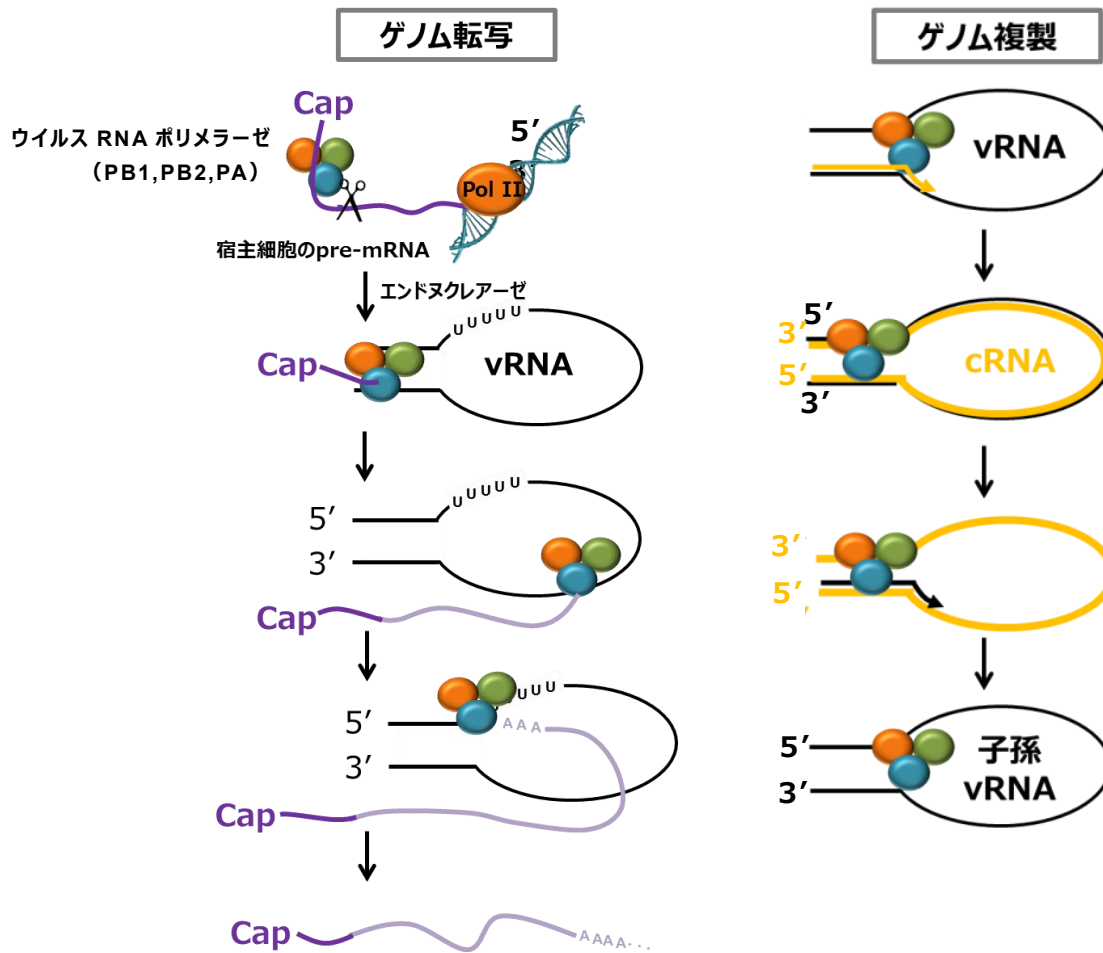


Fig. 3-1 インフルエンザウイルスのゲノム機能の制御機構

川口ら[51]を参考に作成

宿主細胞内に脱殻後、ウイルス RNA ポリメラーゼが宿主の RNA 前駆体のキャップ構造を認識し 10 数塩基下流を切断することで得られた RNA 断片をプライマーとして、転写が開始される。複製は、プライマー非依存的に vRNA を鋳型として、cRNA が合成され、合成された cRNA を鋳型として子孫ウイルスの vRNA が合成される。

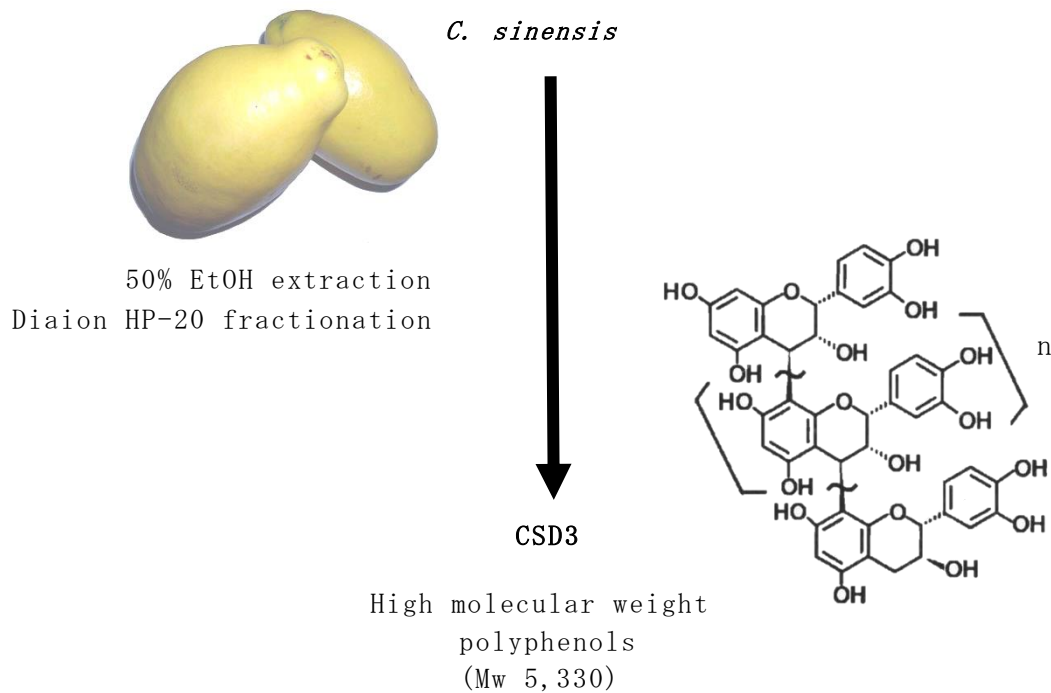


Fig. 3-2 カリン抽出物の調製と分析

前章の方法に従い、カリン乾燥果実を粉砕し、50%エタノール抽出およびHP20カラムを用いてCSD3（40%エタノール溶出画分）を分画した。CSD3画分のポリフェノール量を測定したところ、63%（w/w）含まれており、主要な成分はポリフェノールであることが明らかになった。CSD3をtoluene- α -thiol存在下で酸分解し、分解生成物のHPLC分析を行ったところ、epicatechin-4 β -benzyl thoetherが主な構成物質であり、前章と同様な物質で構成されていることが確認できた。平均分子量について、CSD3画分をアセチル化し、ゲルろ過クロマトグラフィー分析を行ったところ、5,330であることが確認できた。

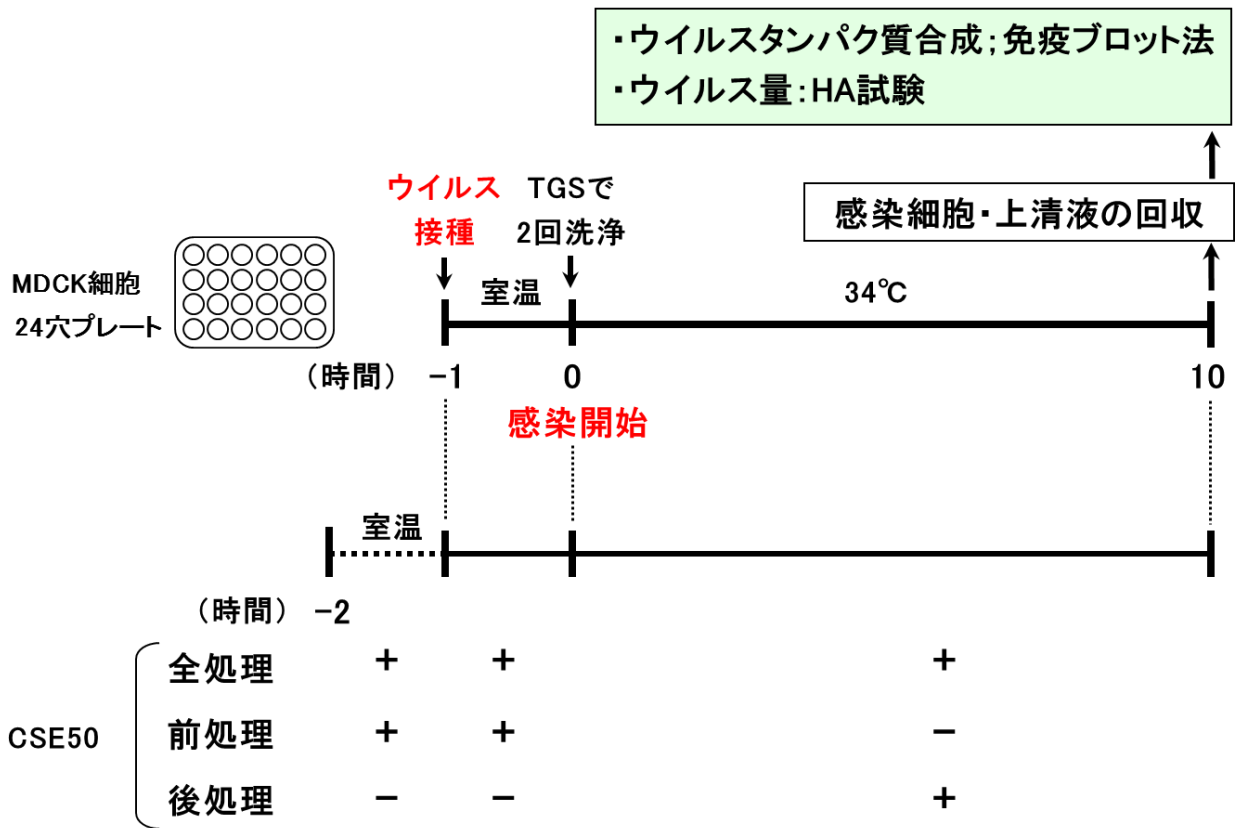


Fig. 3-3 カリン抽出物 CSE50 のウイルスタンパク質段階以降の効果を検証するための評価系

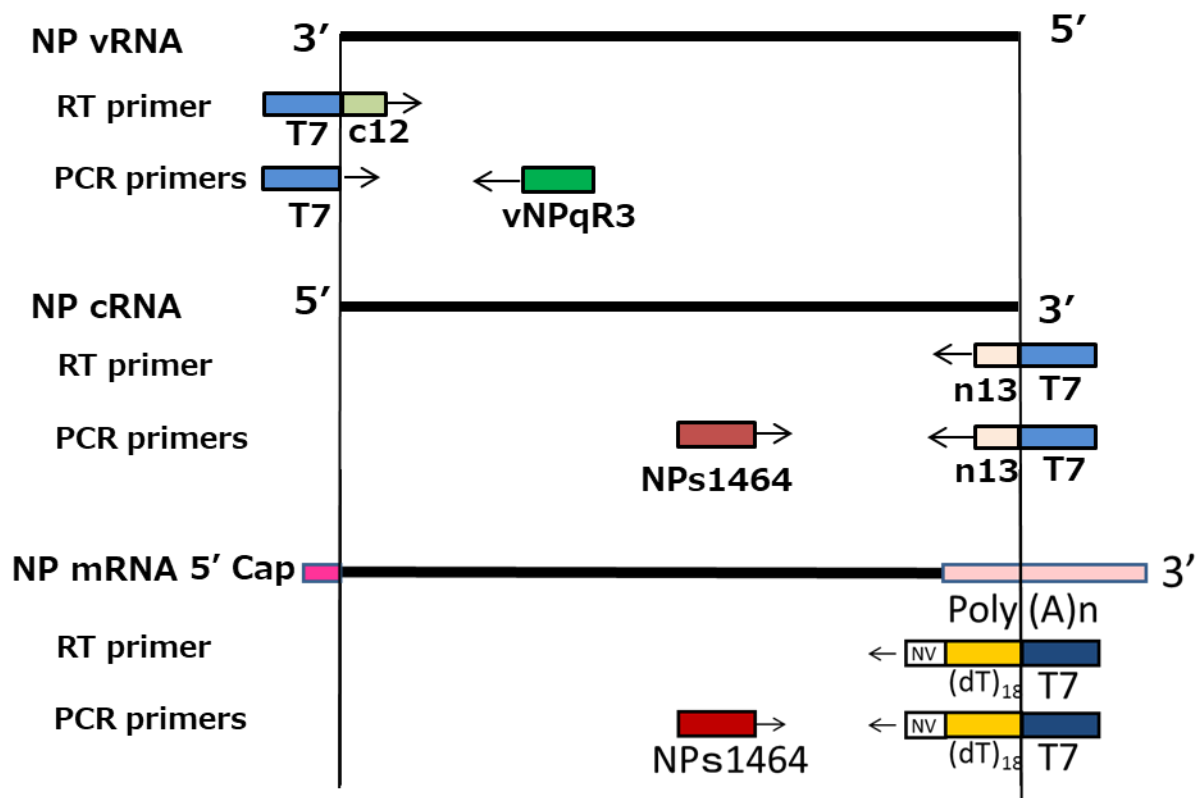


Fig. 3-4 NP vRNA / NP cRNA / NP mRNA の定量のためのプライマー設計
(リアルタイム RT-PCR)

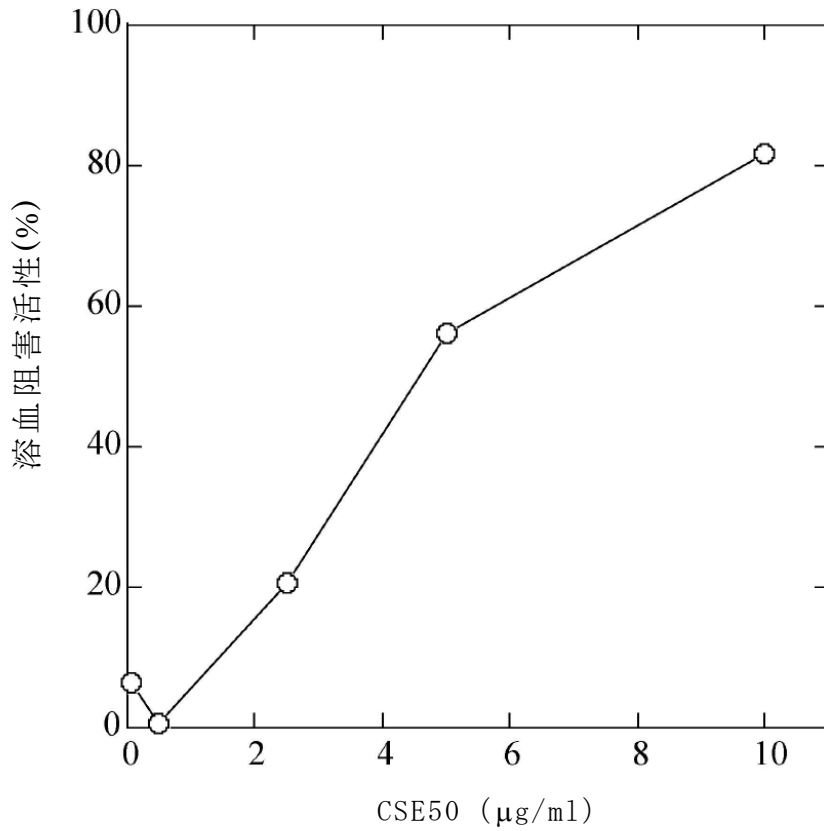


Fig. 3-5 カリン抽出物 CSE50 のインフルエンザウイルスに対する溶血阻害活性

A/Udorn/307/72、CSE50、赤血球を混合し、15 分間氷上で静置した。軽く遠心後、沈殿物を ABS バッファー (80 mM 酢酸ナトリウム、20 mM 酢酸、50 mM 塩化ナトリウム、pH5.3) 懸濁し、37°C 30 分間溶血させた。軽く遠心した後、上清液を吸光度 528 nm で測定した。

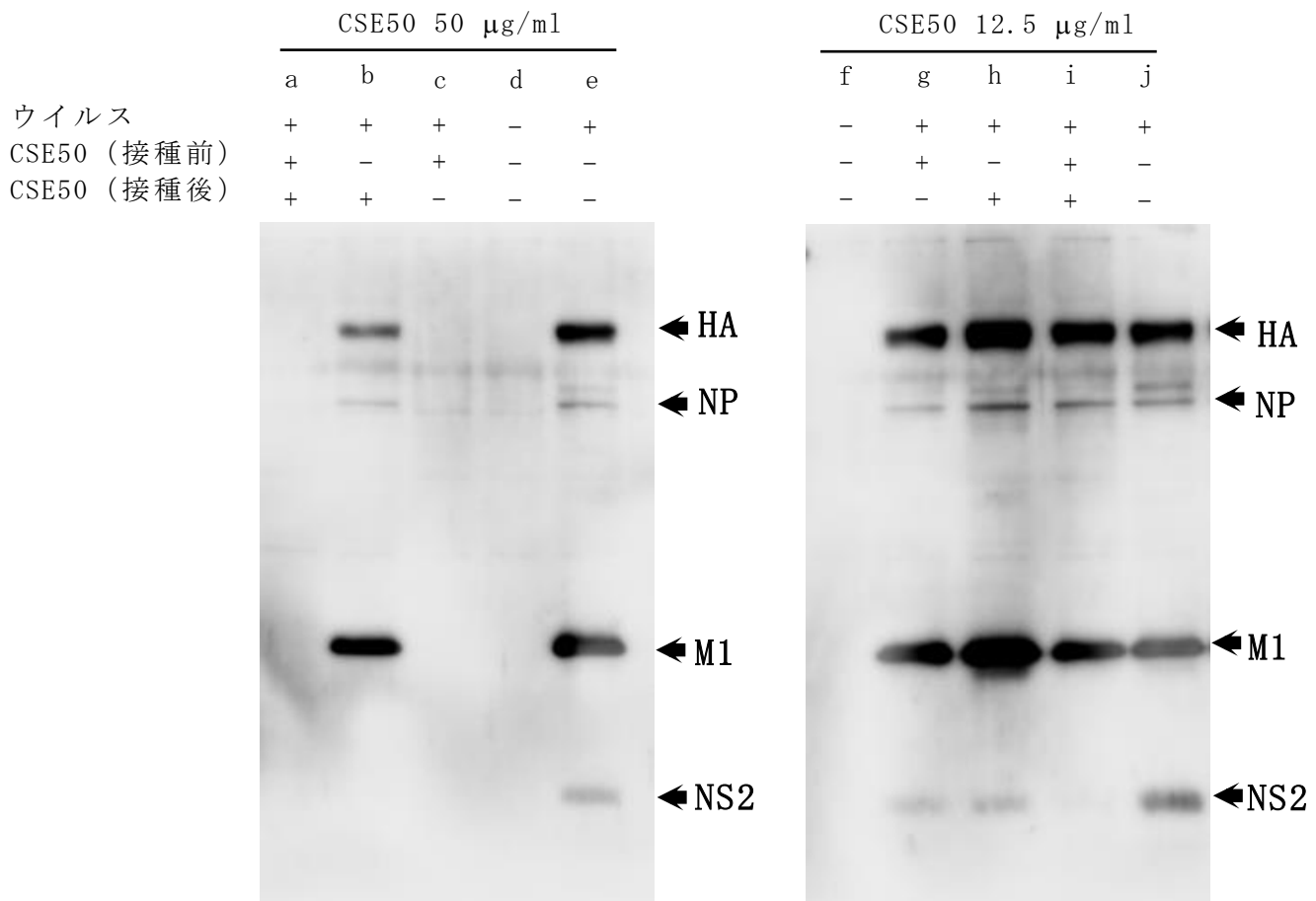


Fig. 3-6 カリン抽出物 CSE50 のウイルスタンパク質合成段階への阻害効果

下記の条件で細胞を 10 時間培養し、ウエスタンブロッティング法により A/Udorn/307/72 に対する抗体を用いてウイルスタンパク質を検出した。

a, i : CSE50 処理ウイルスを MDCK 細胞に接種後、CSE50 存在下で培養した細胞

b, h : ウイルスを MDCK 細胞に接種後、CSE50 存在下で培養した細胞

c, g : CSE50 処理ウイルスを MDCK 細胞に接種後、CSE50 非存在下で培養した細胞

d, f : CSE50 非存在下かつウイルス非感染細胞

e, j : CSE50 非存在下でウイルスを感染させた細胞

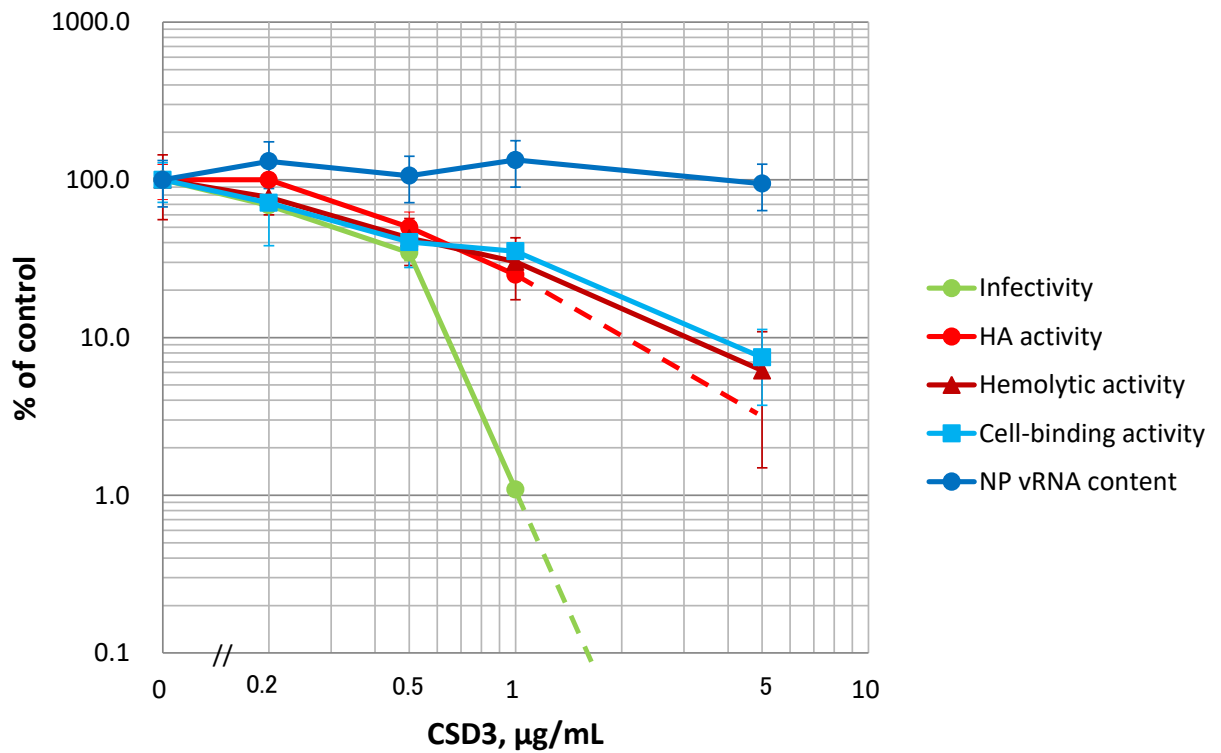


Fig. 3-7 CSD3 処理によるインフルエンザウイルスの生物学的活性への影響

インフルエンザウイルス A/Udorn/72 に対し、様々な濃度の CSD3 を混合し、10 分間、室温にて処理をした。感染性、細胞結合活性、NP vRNA 量は処理後ただちに定量した。感染性については感染中和効果確認試験により、NP vRNA については定量 PCR により定量した。細胞結合活性は、MDCK 細胞に 30 分間室温にて接種後、NP vRNA を定量することで、評価した。HA 活性および溶血活性は鶏の赤血球をウイルスで処理した後、評価した (n=3)。平均値及び標準偏差は MOCK (TGS) 処理ウイルス時の活性を 100 として、%で算出した。感染性及び HA 活性については、5 µg/ml の時は検出されなかった。

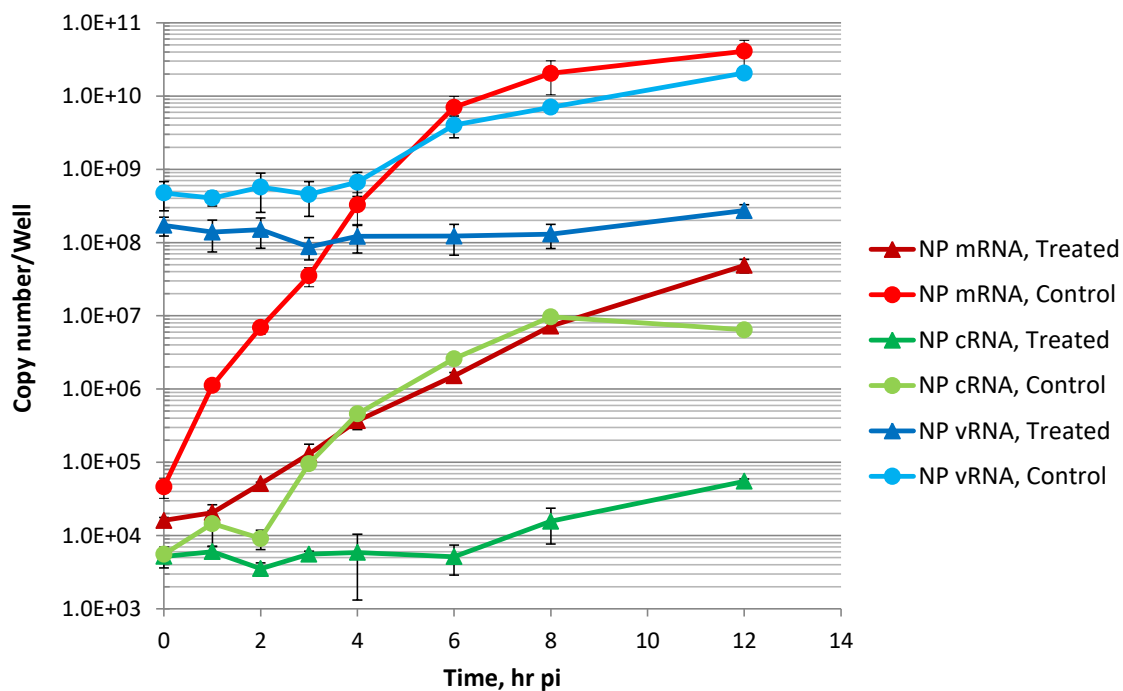


Fig. 3-8 CSD3 処理ウイルスを感染させた MDCK 細胞中のウイルス RNA の合成

インフルエンザウイルス A/Udorn/307/72 に対し、TGS (コントロール)、もしくは CSD3 (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を混合し、10 分間処理した後、MDCK 細胞に接種した。接種後の時間 (図中の pi) において、経時的に、ウイルス RNA 合成量を、NP mRNA、cRNA、vRNA の定量を定量的 PCR により定量した (n=3)。コピー数 (/well) は平均値 \pm 標準偏差で示した。

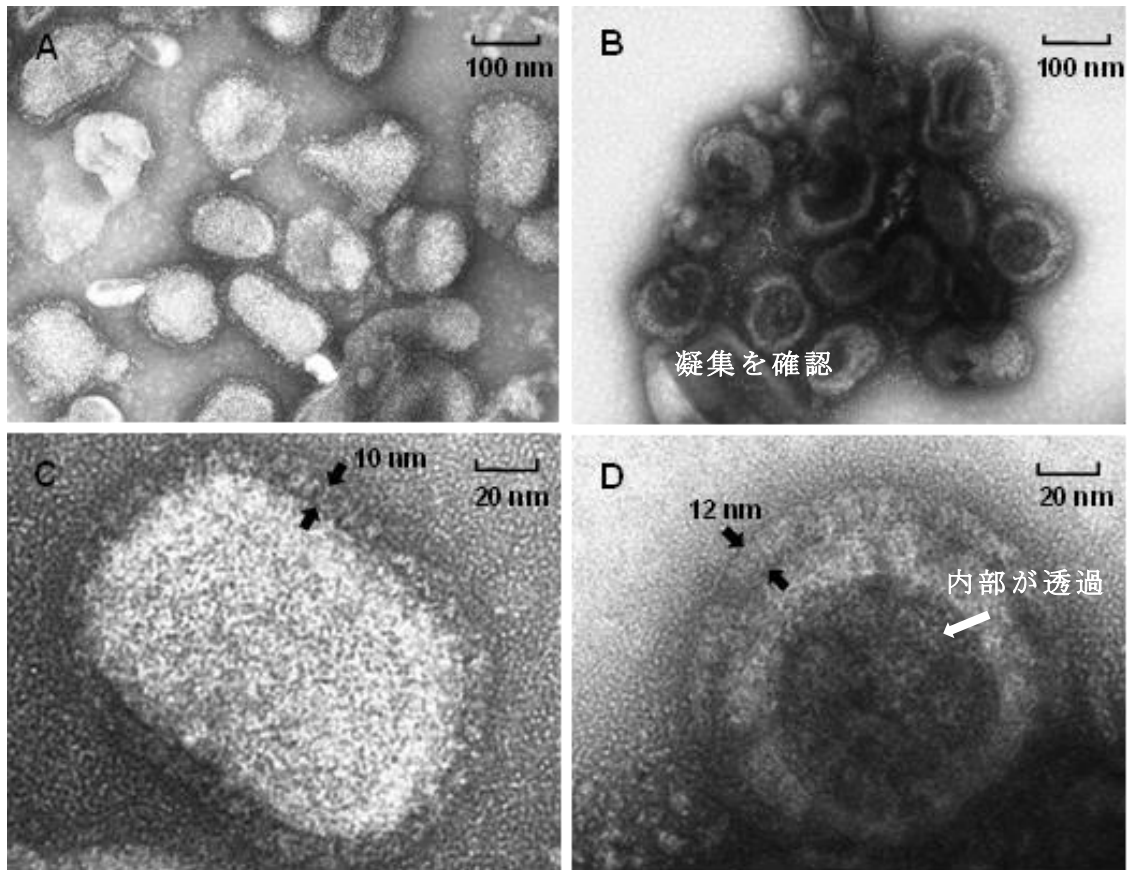
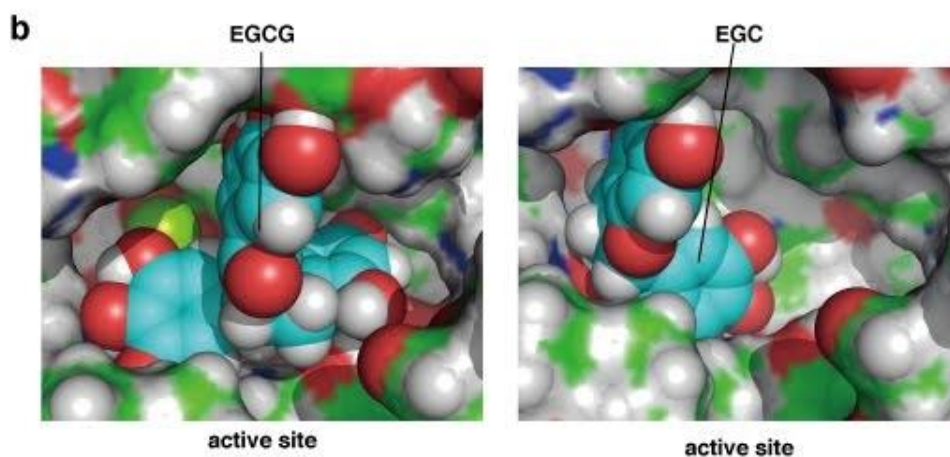
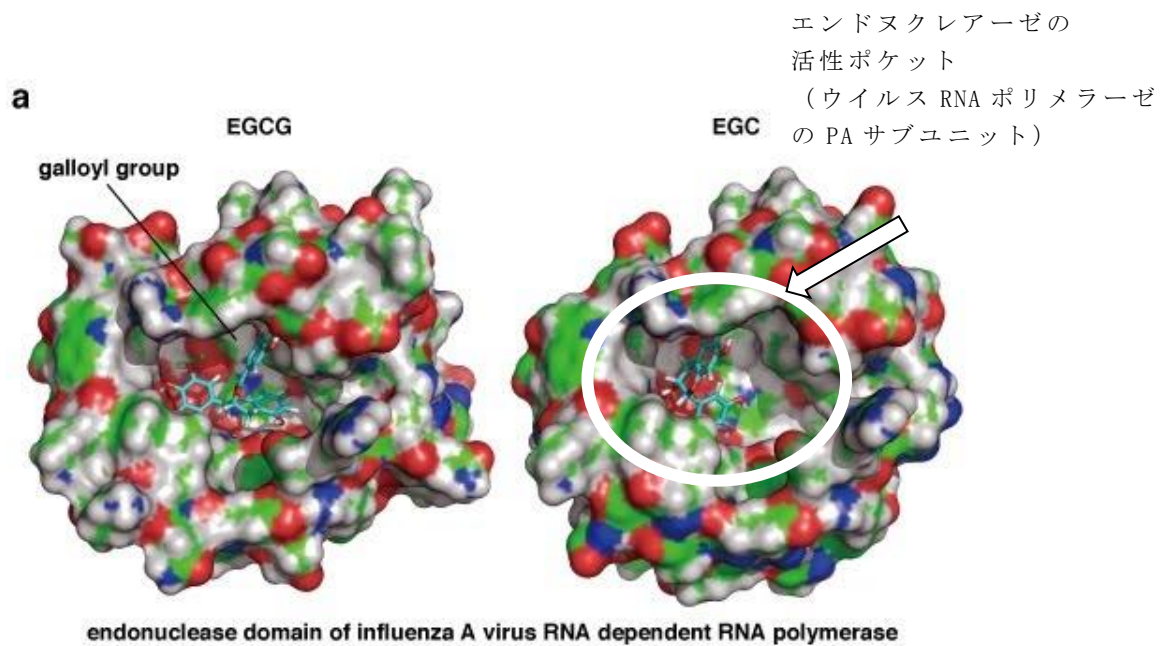


Fig. 3-9 CSD3 のウイルス粒子の超微細構造への影響

Fig. 3-3 および 3-4 と同等な比率となるように、インフルエンザウイルス A/Udorn/72 (5×10^8 PFU/ml) に対し、CSD3 (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を混合し、処理した。室温にて 60 分間、処理した後、ウイルス粒子を 2% 酢酸ウラニルでネガティブ染色した。

a/c: mock 処理 (0.25% エタノール-TGS 液で処理) したウイルス粒子

b/d: CSD3 で処理したウイルス粒子



Kuzuhara *et al.* [65]より引用

Fig. 3-10 エピガロカテキンガレートおよびエピカテキンガレートとウイルス RNA ポリメラーゼの活性ポケットとのドッキングシミュレーション

図中の緑、赤、青、白の色は、それぞれエンドヌクレアーゼドメインの炭素、酸素、窒素、水素原子を示す。

水色は、EGCG または EGC 化合物の炭素原子を示す。

a. インフルエンザ A ウイルス RNA ポリメラーゼのエンドヌクレアーゼドメインと緑茶カテキンのドッキングシミュレーション分析

b. インフルエンザ ARNA ポリメラーゼのエンドヌクレアーゼの活性部位

Table 3-1 カリン抽出物 CSE50 の HA 活性および HI 活性

	CSE50 ($\mu\text{g/ml}$)									
	500	250	125.0	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	2.0	1.0
HA	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
HI	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+

＋：赤血球凝集あり、－：赤血球凝集なし

Table 3-2 カリン抽出物 CSE50 の子孫ウイルス放出段階への阻害効果

CSE50 (接種前)	+	-	+
CSE50 (接種後)	-	+	+
0	2^7	2^7	2^7
5 $\mu\text{g/ml}$	2^7	2^7	2^7
12.5 $\mu\text{g/ml}$	2^6	2^7	2^5
25 $\mu\text{g/ml}$	2	$2^{2.5}$	N. D.
50 $\mu\text{g/ml}$	N. D.	N. D.	N. D.

N. D. Not detected

カリン抽出物 CSE50 が①ウイルス接種前のみ共存 ②ウイルス接種以降のみ共存 ③ウイルス感染全過程に共存、する条件で培養し、10 時間後の培養上清中の HA 価を測定することで、子孫ウイルス放出段階への影響を評価した。得られた HA 価を細胞上清中に放出されたウイルス量とし、 2^n で示した。

第 4 章

Leconostoc mesenteroides NTM048 含有 チョコレート の 免疫機能改善効果

4-1 序

高齢者の死因の上位を占める癌や感染症、動脈硬化といった疾患を引き起こす要因の一つが免疫機能の低下である。免疫機能の低下は、疲労やストレス、運動不足、加齢などが原因としてあげられる。加齢の場合、10代半ば過ぎにピークを迎え、20歳を過ぎたころから徐々に免疫機能の低下が生じ、40代ではピーク時の50%まで低下することが報告されている[69]。したがって、加齢とともに生じる免疫機能の低下速度を抑えることは、健康寿命を延ばすために重要であると考えられる。

第2・3章では、抗インフルエンザウイルス活性を有するカリン抽出物について論じてきた。インフルエンザが免疫機能の低い乳幼児や高齢者に罹患すると、一般的な風邪よりも重症化しやすいことが報告されており[5]、抗インフルエンザウイルス活性を有する素材の開発とともにインフルエンザウイルスと闘うために免疫機能を高める必要があるといえよう。インフルエンザだけでなく、人類は今までに様々な感染症と闘ってきた歴史がある。記録に残っている最初の感染症は、紀元前のエジプトのミイラに痕跡が確認された天然痘だといわれている。以来、ペストやSARS、新型インフルエンザなど多く報告されている。近年では、2019年12月に新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)による感染が中国の湖北省武漢市で初めて確認され、2021年現在でも、世界で猛威をふるっている。軽症もしくはほぼ無症状である感染者が一定数存在することが報告されており[70]、そのことが感染拡大の加速に加担しているのではないかという見解もある。米疾病対策センターにて、アメリカのSARS-CoV-2感染者の健康状態を調査したところ、発症した7,162例のうち、37.6%が1つ以上の基礎疾患があったと報告があり[71]、基礎疾患を持っている人は発症しやすく重症化しやすいことが示唆される。こういった

事実をうけて、人々は自身の免疫機能をあげることに、より一層意識をむけている。50～85歳女性 520名を対象とした Web 調査によると [72]、COVID-19 に対して不安を感じているのは 79.8%と高く、その理由として、「いつ流行が落ち着くかわからない」や「特効薬がない」といった不確実性に関する項目があげられている。心がけていることとしては、「免疫力をあげる」と答えた評価者が 64.8%を占めており、「情報に踊らされないようにする」に次いで高い結果となった。SARS-CoV-2 に対して効力のある治療薬がまだ存在しないような状況では、自身の免疫機能を高めることが非常に重要と考える傾向が高いことがうかがえる。私の研究の目的は、食を通じて「健康で生き生きとした生活」を提供していくことであり、それを脅かす感染症と戦うためには外的要因と内的要因の二方向から考えていく必要があると考えている。そこで第 4 章では、インフルエンザウイルスなどの感染症を予防するために重要な免疫機能そのもの（内的要因）の強化を目的として研究を行った。

免疫機能を高めるためには十分な睡眠や運動といった規則正しい生活習慣や免疫機能を高めるような食材を日々の食事に積極的に取り入れることが重要である。そのような食材としては納豆やヨーグルトなどの発酵食品があげられる。納豆に関しては、ナイーブ T 細胞と樹状細胞に納豆菌を共培養させると、IFN- γ および IL-10 の産生を促進し、IL-17 および IL-4 の産生を阻害する菌株が確認されており [73]、Th1/Th2 比が増加し免疫系が活性化されると考えられる。また、ヨーグルトの主成分である乳酸菌の免疫調節作用として、動物やヒトにおける免疫賦活作用や、アレルギーの発生を阻害する抗アレルギー作用が研究されている [74][75]。

乳酸菌は、ヨーグルトやチーズ、味噌や漬物といった様々な発酵食品の製造において重要な役割をもち、我々の生活において最も身近な微生物の一つ

である。序章で既に述べたように、乳酸菌の機能性については数多く報告されている[5, 12, 14-22]。例えば、*Lactobacillus brevis* は、短鎖脂肪酸の一つである酢酸を産生する[76]。酢酸は、大腸の粘膜細胞のエネルギー源であり、粘液物質であるムチンの分泌を促進することにより、病原菌の感染を防御し、大腸を保護することが報告されている[77-79]。また、*L. brevis* NTT001 配合チョコレートを摂取することにより、腸内の酢酸レベルと乳酸菌数が増加し、腸内環境が改善されることが糞便解析により報告されている[80]。*L. brevis* や *Lactobacillus casei* strain *Shirota*[22-25] など、多くの乳酸菌で免疫賦活効果について報告されている。

本章で報告する *Leuconostoc mesenteroides* 株 NTM048 (NTM048) はグリーンピースから単離された乳酸菌である。Matsuzaki ら[27]により、NTM048を含む食品を2週間マウスに経口投与すると、血漿中および糞便中のIgAレベルの上昇が報告されている。また、パイエル板細胞における遺伝子発現を比較することで作用メカニズムに関しても言及している。2週間摂取により、TGF- β 、CD40L といった T 細胞依存性のサイトカインの発現量が上昇、もしくは上昇傾向であった一方、BAFF や APRIL といった T 細胞非依存性の IgA 産生誘導に関わる因子は減少傾向にあったことを示しており、NTM048 含む食餌により T 細胞依存性の IgA の産生が誘導されたことを報告している[27]。Matsuzaki ら[28]は、NTM048 から産出される EPS を用いてマウスの免疫系への影響についても報告している。EPS をマウスに経口投与すると、パイエル板細胞においてレチノイン酸合成酵素と TGF- β の遺伝子発現が上昇し、結果として糞便中の IgA 産生量が増加していることを示唆している。さらに、脾細胞のフローサイトメトリー分析により、CD3⁺T 細胞の増加および CD4⁺T 細胞/CD8⁺T 細胞の増加することが明らかになっている[28]。これらの結果は NTM048 由来の EPS の摂取がマウスにおいて免疫賦活効果があることを示唆

しているが、ヒトの免疫系に対する影響は明らかになっていなかった。

本章では、マウスにおける研究で報告された NTM048 の免疫賦活効果に着目し、NTM048 配合したチョコレートを用いて、免疫スコアがやや低めの健常者の免疫機能にどのような影響を与えるのかを解析した。また、身体検査、尿検査、および血液検査を実施し、NTM048 配合チョコレートの安全性について確認した。

4-2 材料と方法

4-2-1 試験デザインおよび試験群

2016年6月27日から8月9日の間（4週間）、東京（日本）において、対照群（*L. mesenteroides* strain NTM048 を含まないチョコレート）と NTM048 群（*L. mesenteroides* strain NTM048 配合チョコレート）1:1の割合で割り付ける無作為化二重盲検並行群間比較試験で行った。

4-2-2 被験食

被験食は、チョコレート（4 g/枚×7枚）に NTM048 ($>1.00 \times 10^9$ cfu/日、日東薬品株式会社より入手)を配合することにより調製した。対照食は、外観、味および風味の点で被験食と区別がつかないように調製した。

4-2-3 被験者および倫理的配慮

本試験は、「ヘルシンキ宣言（2013）」及び「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針（2014）」を準拠して、試験実施計画書、同意説明文書、同意書等の記載内容および試験実施の可否について、医療法人社団盛心会タカラクリニック（委員長 高良 毅）の承認を受けて実施した

(UMIN000021989 <https://upload.umin.ac.jp/cgi-open->

[bin/ctr/ctr_view.cgi](#)

?recptno=R000025321)。被験者には、試験の開始前に、研究機関である株式会社オルトメディコにより十分な説明を行い、自由意思により文書による同意を得た。

本試験における被験者の募集は株式会社オルトメディコが行い、次の選抜基準をすべて満たし、かつ除外基準に抵触していない、20代以上の健康成人を対象として実施した。

選抜基準は、①試験責任医師が試験参加に問題ないと判断した者 ②免疫カスコア 13 点以上（免疫グレード II 以上）、23 点以下（免疫グレード IV 以下）の範囲内で相対的に低い者、とした。免疫カスコアは Hirokawa らが考案したスコアであり、免疫機能の状態をいくつかの T 細胞関連指標と組み合わせることにより総合的に評価できる [81-83]。免疫カスコアにより免疫機能の評価は I～V の 5 段階に分類される。免疫機能が最も低いゾーンはグレード I（免疫カスコア 8～12 点、危険圏）に分類され、順に、グレード II（13～16 点、要注意圏）、グレード III（17～20 点、要観察圏）、グレード IV（21～23 点、安全圏）、グレード V（24 点、十分に高い状態）となる。

除外基準は、①悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞の治療の既往歴がある者 ②医薬品（漢方薬を含む）・サプリメントを常用している者 ③乳酸菌飲料、乳酸菌含有食品、乳酸菌製剤等の乳酸菌を多く含む食品、ビフィズス菌や納豆菌などの生菌類含有食品、食物繊維強化食品、オリゴ糖を週 3 回以上、かつ大量に摂取する習慣のある者 ④整腸作用に関与すると思われる特定保健用食品、機能性表示食品、ヨーグルト、乳酸菌飲料を週 3 回以上、かつ大量に摂取する習慣のある者 ⑤アレルギー（試験食品関連製品、医薬品）がある者 ⑥妊娠中、授乳中、あるいは試験期間中に妊娠する意思のある者 ⑦同意書取得日以前の 3 か月間において他の臨床試験に参加していた者 ⑧

その他、試験責任医師が本試験の対象として不適切と判断した者とした。

選抜基準を満たした本試験の参加者は、男性 9 名、女性 35 名であり、平均年齢は 47.0 ± 11.2 歳であった。本試験の参加者 44 名を、株式会社ユックムス製 Microsoft Excel 用アドイン Statlight#11 を用いて、完全無作為法により、NTM048 群と対照群の 2 群に割り付けた。

試験参加者には、参加中の遵守事項として、①試験食品を定められた用法・用量の通り摂取する ②説明会から最終検査までは、暴飲暴食を避け、それまでの食生活および生活習慣を変えない ③試験期間中は試験食品以外の乳製品（ヨーグルト等）、オリゴ糖、乳酸菌などの製品を摂取しない ④検査前日は飲酒と過度の運動を行わない ⑤採血を行う 6 時間前から飲食を禁止する。ただし、水のみ摂取可能とする。機能水は不可とする ⑥試験期間中に体調の変化が生じた場合は、直ちに研究機関へ連絡し、以後の対応の指示を仰ぐなどを徹底するように求めた。

4-2-4 試験スケジュール

被験者は、被験食を 1 日 28 g、自由なタイミングで摂取した。摂取期間は 4 週間であった。被験者は、摂取前および摂取 4 週間後の計 2 回、試験実施医療機関である医療法人社団盛心会タカラクリニックへと通院し、通常健康診断レベルの検査を行った。被験者には摂取期間中、被験者日誌を記録させ、1 週間に 1 回提出させた。

4-2-5 測定項目

以下の項目について、摂取前 1 回、摂取 4 週間後 1 回の計 2 回測定を実施した。

1) 主要評価項目

主要評価項目には、Hirokawa らが開発した免疫カスコアを用いて測定した。免疫カスコア算出のための指標として、T 細胞数、CD4⁺/CD8⁺T 細胞比、ナイーブ T 細胞数、ナイーブ/メモリーT 細胞比、B 細胞数、NK 細胞数、CD8⁺CD28⁺T 細胞数、T 細胞増殖係数の 8 項目を用いた。これらの項目は、フローサイトメトリーと血液学検査の結果より算出され、Hirokawa と Utsuyama が蓄積したデータベースとの照合により、3 段階にスコア化される。健常者の各項目における値のうち累積度数 10%未満の値の場合は 1 点（要改善圏）、累積度数 10~40%未満の場合は 2 点（要観察圏）、累積度数 40%以上の場合は 3 点（安全圏）とするため、算出される免疫カスコアは 8 点~24 点の間に分布する。点数が高いほど、免疫機能は高い状態であることを示す。

2) 副次評価項目

副次評価項目には、上記免疫カスコア算出のための指標であるT細胞数 CD4⁺/CD8⁺T細胞比、ナイーブT細胞（CD4⁺CD45RA⁺T細胞）数、ナイーブ/メモリーT細胞（CD4⁺CD45RO⁺T細胞）比、B細胞数、NK細胞数、CD8⁺CD28⁺T細胞数、T細胞増殖係数の8項目、及びCD8⁺CD28⁺T細胞数から算出するTリンパ球年齢、T細胞増殖係数から算出する免疫力年齢、NK細胞活性、リンパ球を抗CD3抗体とともに培養した時に上清中に産生されるインターフェロン

(IFN) γ とした。CD8⁺CD28⁺T細胞数は年齢と負の相関関係があり[83]、その関係式にCD8⁺CD28⁺T細胞数を代入して算出するのがTリンパ球年齢である。

以下関係式を記す。

$$\text{Tリンパ球の年齢} = (523 - \text{CD8} + \text{CD28} + \text{Tリンパ球数}) / 4.87$$

T細胞増殖係数は、T細胞増殖能とT細胞数により算出される。T細胞増殖能は、採取したT細胞をモノクローナル抗CD3抗体下で3日間培養し、増殖したT細胞をCellTiter96 (Promega製)を用いて比色定量することで得られる。T細胞増殖係数は、その値にT細胞数を以下の通り乗ずることで算出される。

$$\text{T細胞増殖係数} = \text{T細胞増殖能 (OD}_{490}\text{値)} \times \text{T細胞数} (\mu\text{l}) / 1000$$

また、T細胞増殖係数も年齢と負の相関関係があり、その関係式にT細胞増殖係数を代入して算出した年齢が免疫力年齢である。

$$\text{免疫学的年齢} = (2.535 - \text{TCPI}) / 0.0174$$

こうして算定した年齢を、実年齢と比較し、免疫系の機能レベルを想定する。T細胞増殖係数は、T細胞数とT細胞増殖能の測定値から計算される係数で、個体レベルのT細胞の増殖能力を示し、高値であるほど感染に対する抵抗力が高いことを示す。

3) 安全性項目

試験参加者に、試験食品の摂取に伴う医学的に問題のある変動が生じていないか確認することを目的として、安全性評価を行った。安全性項目として、①身体測定・理学検査（身長、体重、BMI、体脂肪率、血圧、収縮期血圧、拡張期血圧、心拍）②尿検査（タンパク質、ブドウ糖、ウロビリノーゲン、ビリルビン、ケトン体、pH、潜血）③末梢血液検査（血液学検査：白血球数、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数、平均赤血球容積、平均赤血球色素濃度）。④血清生化学検査：AST(GOT)、ALT(GPT)、 γ -GTP、

ALP、LD (LDH)、LAP、総ビリルビン、直接ビリルビン、間接ビリルビン、コリンエステラーゼ、ZTT、総蛋白、尿素窒素、クリアチニン、尿酸、CK、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン、血清鉄、血清アミラーゼ、総コレステロール、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、トリグリセリド (TG:中性脂肪)、遊離脂肪酸、グルコース、ヘモグロビン A1c (HbA1c:NGSP)、グリコアルブミン) を測定した。

4) 主観的健康感

被験者の主観的健康感を検討するため、「はっきりした理由はないが、疲れている」「熱っぽい」「理由なく肌がかゆくなることがある」「肌やくちびるが乾きやすい」「鼻がつまりやすい」「のどに痛みやかゆみを感じることもある」「下痢や便秘ではないのに、お腹がすっきりしない」「下痢をしている」「便秘をしている」の9項目についてリッカートスケール法を用いて測定した。リッカートスケール法は、1を「まったくあてはまらない」、2を「ほとんどあてはまらない」、3を「あまりあてはまらない」、4を「少しあてはまる」、5を「かなりあてはまる」、6を「非常に良くあてはまる」の6作法より自身の状態に最も近い番号を選択するよう求めた。

5) 日誌での調査項目

被験者に対して、摂取開始から最終検査の前日まで日誌の記入を実施し、試験食品の摂取回数、生理の有無、体調(良好、ふつう、不良)、乳酸菌食品等摂取状況(有無、量、内容)、体調・生活環境等変化、医薬品服薬状況について調査した。

4-2-5 目標症例数の設定および統計解析

目標症例数は40名、組入症例数は44名であった。目標症例数は、検出力80%、有意水準5%、効果量0.85、1:1の割付を仮定して、設定した。

群内比較は量的変数の場合は対応のある t 検定を、質的変数の場合は Wilcoxon の符号付順位検定を行い、摂取前と摂取 4 週間後の測定値を比較した。群間比較は、データの分布に従って、Student の t 検定または共分散分析を用いて行った。平行性の検定および傾きの検定を行い、有意性が確認できた場合は、摂取前の測定値を共変量に投入して共分散分析を実行した。質的変数の場合は Mann-Whitney の U 検定を行い、摂取前と摂取 4 週間後の測定値を比較した。分析には、SPSS (version 23.0; 日本 IBM) と Microsoft Excel 2013 を用いて有意水準は 5% とした。また、摂取率が 70% に満たない被験者は解析対象から除外した。

4-3 結果

Fig. 4-1 にエントリーから統計解析までの流れを示した。本試験への参加に同意した 67 名のボランティアを対象にスクリーニング検査を実施した。検査の結果、比較的低い免疫力スコアを示した 44 名を組入れ、対照食群 22 名と NTM048 群 22 名の 2 群に割付を行った。参加した 44 名のうち、対照群の 1 名が体調不良を理由に試験継続が困難となり追跡不可能となった。体調不良と被験食の因果関係は認められなかった。摂取率は両群とも 95% 以上であり、加えて日誌やヒアリングの結果、遵守事項を守らなかった被験者はおらず、有害事象も認められなかった。一方で、対照群において、摂取前検査時点で、BMI が 30 kg/m^2 以上であり、WHO の掲げるガイドラインにおいて肥満症と判断された被験者が 1 名いた。本試験は健常者への介入の効果を評価するため、解析からは除外した。

従って、解析対象者は、対照群 20 名（男性 3 名、女性 17 名： 45.8 ± 9.9 歳）、NTM048 群 22 名（男性 5 名、女性 17 名： 46.8 ± 11.6 歳）であった。Table 4-1 に解析対象者の年齢（歳）、性別、身長（cm）、体重（kg）、BMI (kg/m^2)、

体脂肪率(%)、収縮期血圧 (mmHg)、拡張期血圧(mmHg)、心拍数 (bpm) を示した。結果は、数値±標準偏差で示した。

4-3-1 免疫学的指標

(1) 免疫カスコア

対照群及び NTM048 群における摂取前後の免疫カスコアを Fig. 4-2 に示した。免疫カスコアは本研究の主要評価項目と位置付けた項目であり、8つの免疫学的パラメータを用いて、包括的な免疫レベルを表すことができる[83]。NTM048 群では摂取前値 17.7 ± 1.9 から摂取後の値 18.6 ± 1.6 に有意な増加が確認された ($p = 0.015$) が、対照群では摂取前値 (17.8 ± 1.9) と比較して摂取後値 (17.8 ± 2.0) は有意な差は認められなかった ($p = 1.000$)。群間比較では、対照群と比較して、NTM048 群の免疫カスコアは有意に高値を示した ($p = 0.049$)。免疫カスコアをもとに、免疫機能をグレード I (危険圏) ~ グレード V (十分に高い状態) の 5 段階に分類することができる。NTM048 配合チョコレート摂取群は有意にスコアが上昇したものの、グレード III「要観察圏」に分類され、変化はなかった。

(2) 免疫パラメータ

CD8⁺T 細胞、CD8⁺CD28⁺T 細胞およびメモリーT 細胞数は、NTM048 群において有意に増加した ($p = 0.0334$ 、 $p = 0.007$ 、 $p = 0.006$) が、対照群では有意な増加は確認されなかった。さらに、摂取後値の群間比較では、統計的に有意な差が確認された ($p = 0.047$ 、 $p = 0.045$ 、 $p = 0.022$) (Table 4-2)。リンパ球、CD3⁺T 細胞および CD4⁺T 細胞数については、NTM048 において摂取前後で有意な増加が確認された ($p = 0.020$ 、 $p = 0.022$ 、 $p = 0.20$)。T リンパ球年齢は、NTM048 群において摂取前値 (55.3 ± 8.8 歳) と比較して摂取後値 (54.0 ± 9.3 歳) は有意に減少した ($p = 0.025$) が、対照群では、T リンパ

球年齢の前値は 52.6 ± 9.2 歳、後値は 52.8 ± 9.9 歳であり、有意差は観察されなかった。免疫力年齢に関しては、NTM048 群においては 52.6 ± 11.5 歳（摂取前値）から 49.9 ± 12.7 歳（摂取後値）に有意に減少した ($p = 0.009$) が、対照群および群間比較において有意差は観察されなかった (Table 4-3)。

Table 4-4 は、T 細胞増殖活性および T 細胞増殖係数 (TCPI) の結果を示した。摂取後の T 細胞増殖活性は、対照群において有意な増加を示した ($p = 0.047$) が、NTM048 群においては増加傾向を示した ($p = 0.085$)。T 細胞増殖係数については、NTM048 群および対照群の両群において、摂取前値と比較して摂取後値の有意な増加が確認された ($p = 0.037$ 及び $p = 0.017$)。一方群間における統計学的有意性は観察されなかった。

好中球、ナイーブ T 細胞、B 細胞、NK 細胞の集団、CD4 / CD8 比、ナイーブ T / メモリー T 細胞比、免疫度、NK 細胞活性、および IFN- γ の間においては、摂取前後値、群間差のいずれも有意差は認められなかった (Table 4-5)。

4-3-2 安全性評価

NTM048 配合チョコレート安全性は、摂取前および摂取 4 週間後の身体測定、理学検査、尿検査、末梢血液検査、アンケートによる自覚症状の調査により評価した。結果、無機リンのレベルが対照群および NTM048 群の両群において、摂取前と比較して有意な増加が確認された。しかし、医師による診断では、健康診断で得られた他のすべてのデータが正常範囲内であることも考慮に入れて、全員が健常者と認められた (Table 4-6)。

4-3-3 主観的健康感

摂取前と摂取 4 週間後の間に有意差が認められた項目は、「肌やくちびる

が乾きやすい」であり、プラセボ群の中央値は 3.5 から 2.0 に有意に減少し ($p = 0.017$)、NTM048 群の中央値は 4.0 から 2.5 に減少した ($p = 0.008$)。有意差のある項目が認められたものの、医学的に問題のある変化ではなかった (Table 4-7)。

4-4 考察

本研究では、健常者を対象として、NTM048 配合チョコレートの免疫力賦活効果を評価することを目的として実施した。

まず、包括的なアルゴリズムを用いて算出されている免疫スコア [78-80] について調べたところ、NTM048 配合チョコレート摂取群において、有意な増加が確認され、群間差についても対照群と比較して有意に高値を示した。これらの結果は NTM048 配合チョコレートの摂取が免疫学的機能の向上に有効であることを示している。ただし、免疫スコアをもとに算出できる免疫グレードでは、「要観察圏」に分類され、摂取前と比較して変化は確認できなかった。このことは、その効果は緩やかであることを示している。本研究は 4 週間の摂取による効果確認試験であったが、長期間摂取することにより、「要観察圏」からグレード IV (安全圏) へ移行できる可能性も考えられる。

NTM048 は、エンドウ豆由来の植物性乳酸菌であり、exopolysaccharides (EPS) を大量に産生する菌である。NTM048 由来の EPS を摂取したマウスにおいて、CD4⁺T 細胞の増加が確認されている [28]。本研究においても、NTM048 配合チョコレートの 4 週間摂取により、過去の報告と同様、CD4⁺T 細胞の増加が確認された。先行研究において NTM048 を含む食餌を 2 週間マウスに経口投与すると、T 細胞依存的な IgA 産生が確認されており [27]、本研究においても IgA の産生量が増加している可能性が考えられるが測定しておらず、

検証するためには新たな臨床研究が必要である。B細胞についてはNTM048非配合チョコレートと比較して有意に細胞数が多いことが確認されたが、前後差は確認できず、本研究では結論が得られなかった。

CD4⁺ T細胞はヘルパーT細胞(Th細胞)に属する細胞である。Th細胞には、Th1やTh2、Th17が存在し、細胞性免疫、アレルギー性炎症、感染防御などの免疫学的作用をもたらす[84][85]。本研究において、Th1細胞が産生するINF- γ 量を測定した。しかし、測定値が検出限界以下であった被験者が両群ともに15名を占めていたため、有意な差は観察されなかった。したがって、本研究では、どの種のTh細胞が増加したかは明らかではない。今後、どのTh細胞の数が増えているのか、各Th細胞特異的な抗体による細胞数の分析や産生されるサイトカイン量の分析なども含め、詳細に解析をしていく必要がある。本研究では、CD4⁺T細胞だけでなく、重要な3つのT細胞亜種であるCD8⁺T細胞、CD8⁺CD28⁺T細胞およびメモリーT細胞も摂取前後および群間において有意差が確認された。CD8⁺T細胞は、免疫学的には、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞を傷害する働きがあり、その機能を増強させることは免疫機能をサポートする上で、大きな意義がある。

Hirokawaらが開発したアルゴリズムを用いることにより、免疫機能の「年齢」の指標であるTリンパ球年齢および免疫力年齢を推測することができる。Tリンパ球年齢はCD8⁺CD28⁺T細胞数を用いて算出され、Tリンパ球の年齢が低いと、免疫系の機能が若いことを示す。一方、免疫力年齢はT細胞増殖係数より算出される。T細胞増殖係数は、T細胞数とT細胞増殖能の測定値から計算される係数で、個体レベルのT細胞の増殖能力を示し、高値であるほど感染に対する抵抗力が高いことを示す。Tリンパ球年齢および免疫力年齢の両項目について、NTM048配合チョコレート摂取により有意な減少を確認されたが、対照群との差は観察されなかった。T細胞増殖係数は

NTM048 群と対照群の両群で有意に増加しており、チョコレート自体に T 細胞の増殖能力をアップさせる効果がある可能性がある。両群とも T 細胞増殖能力が上昇したために有意な差が検出できなかったことが推察される。

最後に、NTM048 配合チョコレートの安全性の評価を行った。無機リンの平均値が、両群ともに試験開始時より摂取 4 週間で基準値上限以上に有意に上昇した。他の検査値等も考慮し、医師の診断では全員が健常者であると認められたことから、安全な食品であるといえる。

4-5 結論

本研究は、免疫機能がやや低下している成人健常者の免疫機能に対する NTM048 ($> 1.00 \times 10^9$ CFU /日) 配合チョコレートの効果を評価することを目的とした。被験食を 4 週間摂取すると、対照群と比較して、NTM048 群において有意な免疫カスコアの上昇が観察された。この結果は、NTM048 配合チョコレートの摂取が T 細胞系の免疫機能を活性化することによってヒトの免疫機能を改善することを示唆している。

また、NTM048 配合チョコレートの安全性を確認するため、身体測定・理学検査、尿検査、末梢血液検査、アンケートによる自覚症状の調査を実施した。摂取 4 週間後の間に有意な変動が認められる項目が散見されたが、医師による診断では全員が健常者であると認められたことから、NTM048 配合チョコレートの 4 週間の継続摂取は本試験条件下では安全な食品であるといえる。

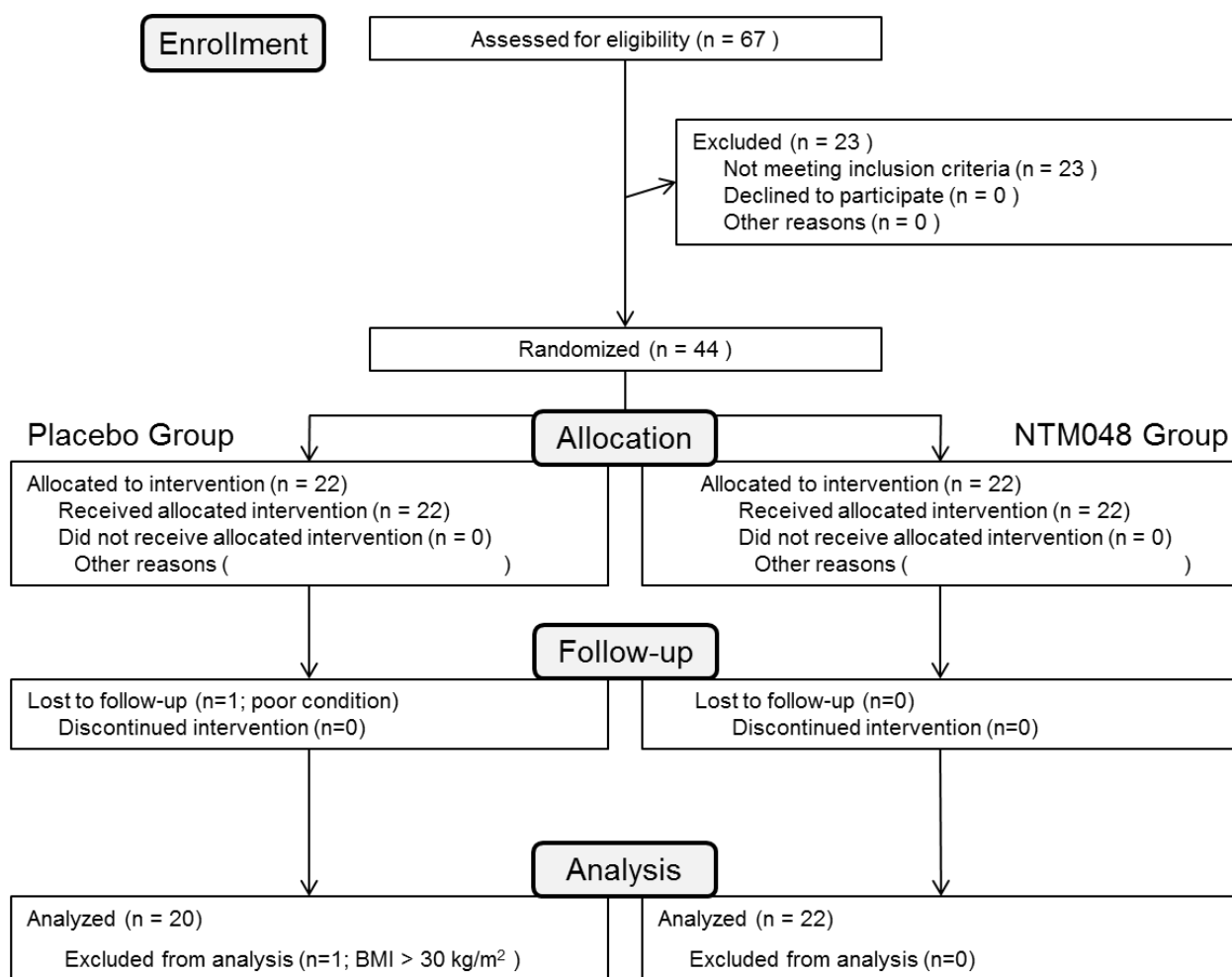


Fig. 4-1 本章のヒト介入試験のエントリーから統計解析までの流れ

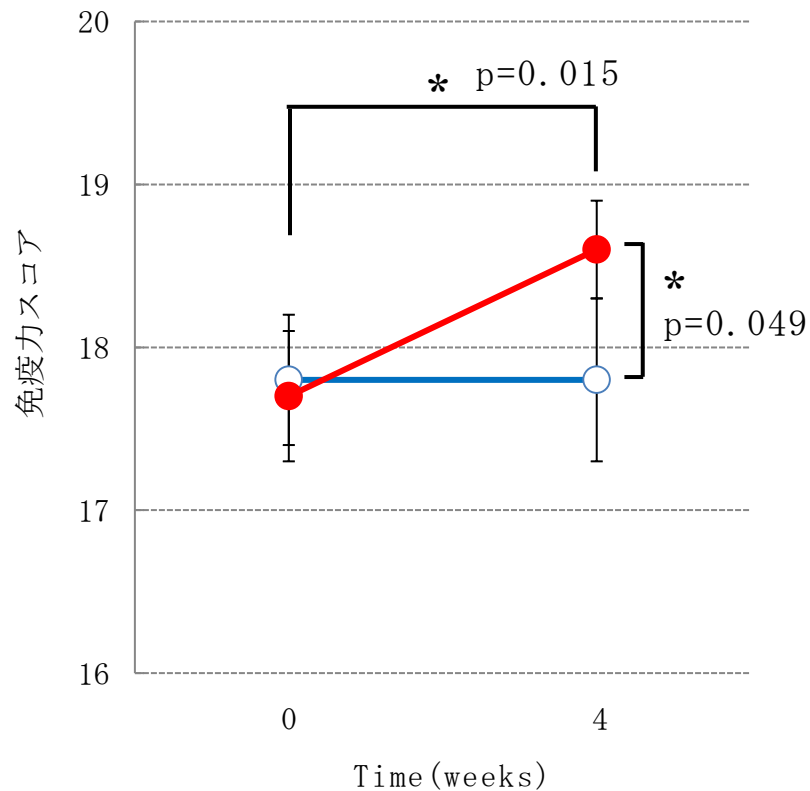


Fig. 4-2 NTM048 配合チョコレート摂取による免疫レスコアの変化

(主要評価項目)

試験食品摂取前(0週)及び摂取後(4週)における免疫レスコアの変化を示した。対照食品は 17.8 ± 0.4 点(平均値 \pm 標準偏差)から 17.8 ± 0.5 点であったのに対し、NTM048 配合チョコレートでは、 17.7 ± 0.4 点から 18.6 ± 0.3 点となり有意にスコアが上昇した(対応のある t 検定)。また、群間差については平行性の検定および回帰の有意性を確認後、摂取前値を共変量として共分散分析を行い、有意な差を確認した。

●—● :NTM048 摂取群 ○—○ :Placebo 摂取群

Table 4-1 試験参加者背景

	Placebo (n=20)		NTM048 (n=22)	
Age (years)	45.8	± 9.9	46.8	± 11.6
Range (years)	30-69		21-63	
Male/female (n)	3/17		5/17	
Height (cm)	159.7	± 7.4	161.8	± 6.3
Body weight (kg)	52.1	± 10.1	53.9	± 9.4
Body mass index (kg/m ²)	20.4	± 3.2	20.5	± 2.6
Body fat percentage (%)	21.8	± 6.8	21.4	± 5.5
Systolic blood pressure (mmHg)	111.2	± 10.0	115.8	± 17.2
Diastolic blood pressure (mmHg)	70.9	± 5.8	74.2	± 12.1
Heart rate (bpm)	69.1	± 8.7	70.5	± 8.6

表中の試験参加者背景の計測値は平均値±標準偏差で示した。

Table 4-2 免疫パラメータの変化 (I)

評価項目	群	摂取前	摂取4週間後	p value
CD8 ⁺ T cells (μL^{-1})	Placebo	261 ± 98	264 ± 126	0.859
	NTM048	234 ± 125	293 ± 196	0.034 *
CD8 ⁺ CD28 ⁺ T cells (μL^{-1})	Placebo	197 ± 72	197 ± 99	0.981
	NTM048	152 ± 67	179 ± 71	0.007 *
Memory T cells (μL^{-1})	Placebo	468 ± 122	469 ± 123	0.938
	NTM048	477 ± 146	543 ± 166	0.006 *

各測定値は平均値±標準偏差で示した。

摂取前後の比較は、対応のある t 検定（有意水準 5%）で評価した。プラセボ群と NTM048 群の群間比較は、平行性の検定及び傾きの有意性を確認後、摂取前値を共変量として共分散分析（有意水準 5%）を実施し、評価した。

Table 4-3 免疫パラメータの変化 (II)

評価項目	群	摂取前	摂取4週間後	p value	
lymphocytes (μL^{-1})	Placebo	1517 \pm 283	1574 \pm 327	0.238	0.094
	NTM048	1549 \pm 371	1835 \pm 604	0.020 *	
CD3 ⁺ T cells (μL^{-1})	Placebo	1113 \pm 261	1154 \pm 280	0.275	0.083
	NTM048	1104 \pm 239	1317 \pm 507	0.022 *	
*CD4 ⁺ T cells (μL^{-1})	Placebo	748 \pm 219	762 \pm 225	0.560	0.094
	NTM048	768 \pm 243	841 \pm 231	0.020 *	
*T-lymphocyte age (years)	Placebo	52.6 \pm 9.2	52.8 \pm 9.9	0.815	0.085
	NTM048	55.3 \pm 8.8	54.0 \pm 9.3	0.025 *	
*Immunological age (years)	Placebo	52.5 \pm 10	50.7 \pm 9.4	0.131	0.511
	NTM048	52.6 \pm 11.5	49.9 \pm 12.7	0.009 *	

測定値は平均値 \pm 標準偏差で示した。

摂取前後の比較は、対応のある t 検定（有意水準 5%）で評価した。プラセボ群と NTM048 群の群間比較は、平行性の検定および傾きの有意性が確認できた場合は共分散分析（*）で評価し、確認できなかった場合は Student の t 検定で評価した（有意水準 5%）。

Table 4-4 免疫パラメータの変化 (III)

評価項目	群	摂取前	摂取4週間後	p value
T cell proliferative activity	Placebo	1.38 ± 0.2	1.51 ± 0.2	0.047 *
	NTM048	1.46 ± 0.2	1.53 ± 0.2	0.085
T-cells proliferation index (TCPI)	Placebo	1.56 ± 0.5	1.77 ± 0.6	0.037 *
	NTM048	1.62 ± 0.5	2.01 ± 0.8	0.017 *

測定値は平均値±標準偏差で示した。

摂取前後の比較は、対応のある t 検定（有意水準 5%）で評価した。プラセボ群と NTM048 群の群間比較は、平行性の検定及び傾きの有意性を確認後、摂取前値を共変量として共分散分析（有意水準 5%）を実施し、評価した。

Table 4-5 免疫パラメータの変化 (IV)

評価項目	群	摂取前	摂取4週間後			p value	
Neutrophils (μL^{-1})	Placebo	2976 \pm 860	2775	\pm	731	0.38	0.941
	NTM048	2554 \pm 923	2757	\pm	816	0.113	
*Naive T cells (μL^{-1})	Placebo	280 \pm 119	293	\pm	130	0.265	0.859
	NTM048	291 \pm 131	298	\pm	121	0.714	
*B cells (μL^{-1})	Placebo	230 \pm 64	218	\pm	65	0.269	0.040 *
	NTM048	265 \pm 134	289	\pm	136	0.163	
*NK cells (μL^{-1})	Placebo	166 \pm 71	187	\pm	70	0.066	0.363
	NTM048	200 \pm 121	262	\pm	258	0.257	
CD4/CD8 T cells ratio	Placebo	3.47 \pm 2.2	4.54	\pm	5.2	0.156	0.118
	NTM048	5.79 \pm 7.6	4.44	\pm	4.4	0.139	
*Naive/Memory T cell ratio	Placebo	0.60 \pm 0.2	0.63	\pm	0.2	0.377	0.166
	NTM048	0.63 \pm 0.3	0.58	\pm	0.2	0.228	
*immunity grade	Placebo	2.80 \pm 0.4	2.80	\pm	0.5	1	0.302
	NTM048	2.82 \pm 0.4	2.95	\pm	0.5	0.186	
*NK cells activity (%)	Placebo	48.0 \pm 19.0	46.6	\pm	16.6	0.452	0.470
	NTM048	48.9 \pm 13.4	50.1	\pm	16.4	0.754	
IFN- γ (pg/mL)	Placebo	13.5 \pm 41.8	22.3	\pm	83.4	0.359	0.345
	NTM048	3.12 \pm 3.4	3.64	\pm	4.1	0.164	

測定値は平均値 \pm 標準偏差で示した。

摂取前後の比較は、対応のある t 検定（有意水準 5%）で評価した。プラセボ群と NTM048 群の群間比較は、平行性の検定および傾きの有意性が確認できた場合は共分散分析（*）で評価し、確認できなかった場合は Student の t 検定で評価した（有意水準 5%）。

Table 4-6 末梢血液中のパラメータ変化

A) プラセボ群 (n=20)

検査項目	基準値	単位	摂取前		摂取後		P value
白血球数	3300-9000	/ μ L	4880.0 \pm	965.0	4740.0 \pm	858.6	0.566
赤血球数	男性: 430-570 女性: 380-500	$\times 10^4$ / μ L	434.2 \pm	32.4	446.8 \pm	40.0	0.002 *
ヘモグロビン	男性: 13.5-17.5 女性: 11.5-15.0	g/dL	12.9 \pm	1.3	13.0 \pm	1.5	0.213
ヘマトクリット	男性: 39.7-52.4 女性: 34.8-45.0	%	40.4 \pm	3.2	42.6 \pm	3.9	0.000 *
血小板数	14.0-34.0	$\times 10^4$ / μ L	23.6 \pm	4.9	23.7 \pm	6.4	0.878
MCV	85-102	fL	93.2 \pm	6.1	95.5 \pm	6.8	0.000 *
MCH	28.0-34.0	pg	29.7 \pm	2.3	29.2 \pm	2.5	0.002 *
MCHC	30.2-35.1	%	31.8 \pm	0.9	30.5 \pm	1.0	0.000 *
好中球率	40.0-75.0	%	60.1 \pm	7.4	58.1 \pm	7.3	0.250
リンパ球率	18.0-49.0	%	31.7 \pm	6.1	33.7 \pm	6.5	0.208
単球率	2.0-10.0	%	4.8 \pm	1.1	5.0 \pm	1.4	0.490
好酸球率	0.0-8.0	%	2.6 \pm	2.0	2.4 \pm	1.4	0.732
好塩基球率	0.0-2.0	%	0.8 \pm	0.5	0.8 \pm	0.5	0.871
好中球数	-	/ μ L	2975.9 \pm	860.2	2775.0 \pm	731.5	0.383
リンパ球数	-	/ μ L	1517.3 \pm	282.8	1574.2 \pm	327.3	0.238
単球数	-	/ μ L	232.1 \pm	61.6	234.4 \pm	63.5	0.896
好酸球数	-	/ μ L	117.4 \pm	82.5	120.4 \pm	86.0	0.826
好塩基球数	-	/ μ L	37.3 \pm	22.4	36.0 \pm	20.2	0.734
AST (GOT)	10-40	U/L	18.7 \pm	4.9	18.2 \pm	3.7	0.469
ALT (GPT)	5-45	U/L	14.6 \pm	5.3	13.9 \pm	5.7	0.469
γ -GT (γ -GTP)	男性: 80以下 女性: 30以下	U/L	20.4 \pm	10.6	20.2 \pm	9.4	0.838
ALP	100-325	U/L	171.6 \pm	55.6	165.4 \pm	51.0	0.152
LD (LDH)	120-240	U/L	163.8 \pm	23.5	173.1 \pm	23.5	0.000 *
LAP	男性: 45-81 女性: 37-61	U/L	47.2 \pm	6.6	47.5 \pm	5.3	0.805

検査項目	基準値	単位	摂取前		摂取後		P value
総ビリルビン	0.2-1.2	mg/dL	0.9 ±	0.4	0.8 ±	0.3	0.718
直接ビリルビン	0.0-0.2	mg/dL	0.1 ±	0.0	0.1 ±	0.0	1.000
間接ビリルビン	0.2-1.0	mg/dL	0.8 ±	0.3	0.7 ±	0.3	0.720
コリンエステラーゼ (ChE)	男性: 234-493 女性: 200-452	U/L	277.8 ±	45.0	279.6 ±	54.4	0.734
ZTT	2.0-12.0	U	7.5 ±	2.4	7.1 ±	2.2	0.014 *
総蛋白	6.7-8.3	g/dL	7.1 ±	0.3	7.2 ±	0.3	0.214
尿素窒素	8.0-20.0	mg/dL	12.5 ±	3.4	11.6 ±	3.4	0.048 *
クレアチニン	男性: 0.61-1.04 女性: 0.47-0.79	mg/dL	0.6 ±	0.1	0.7 ±	0.1	0.793
尿酸	男性: 3.8-7.0 女性: 2.5-7.0	mg/dL	4.3 ±	1.3	4.4 ±	1.1	0.663
CK	男性: 60-270 女性: 40-150	U/L	96.4 ±	35.8	100.8 ±	49.1	0.710
ナトリウム	137-147	mEq/L	141.4 ±	1.7	142.0 ±	1.9	0.192
カリウム	3.5-5.0	mEq/L	3.9 ±	0.4	3.9 ±	0.3	0.931
クロール	98-108	mEq/L	102.7 ±	2.0	102.0 ±	1.7	0.217
カルシウム	8.4-10.4	mg/dL	9.4 ±	0.4	9.5 ±	0.3	0.119
無機リン	2.5-4.5	mg/dL	3.8 ±	0.4	5.1 ±	0.6	0.000 *
血清鉄	男性: 50-200 女性: 40-180	µg/dL	118.6 ±	46.9	112.7 ±	34.7	0.603
血清アミラーゼ	40-122	U/L	81.9 ±	28.7	85.3 ±	28.2	0.058
総コレステロール	120-219	mg/dL	197.5 ±	37.3	201.1 ±	30.9	0.379
HDL-コレステロール	男性: 40-85 女性: 40-95	mg/dL	70.0 ±	16.8	71.9 ±	15.1	0.187
LDL-コレステロール	65-139	mg/dL	112.3 ±	30.3	113.9 ±	28.0	0.596
TG (中性脂肪)	30-149	mg/dL	66.3 ±	24.8	67.9 ±	28.2	0.727
遊離脂肪酸	0.10-0.90	mEq/L	0.6 ±	0.3	0.6 ±	0.2	0.287
グルコース	70-109	mg/dL	79.2 ±	6.8	81.2 ±	5.3	0.241
HbA1c (NGSP)	4.6-6.2	%	5.4 ±	0.4	5.3 ±	0.3	0.001 *
グリオアルブミン	12.3-16.5	%	13.9 ±	0.9	14.0 ±	1.0	0.265

測定値は平均値±標準偏差で示した。

摂取前後の比較は、対応のある t 検定（有意水準 5%）で評価した。プラセボ群と NTM048 群の群間比較は、平行性の検定および傾きの有意性が確認できた場合は共分散分析（*）で評価し、確認できなかった場合は Student の t 検定で評価した（有意水準 5%）。

B) NTM048 群 (n=22)

検査項目	基準値	単位	摂取前		摂取後		P value
白血球数	3300-9000	/ μ L	4468.2	1070.1	5036.4	1075.1	0.008 *
赤血球数	男性: 430-570 女性: 380-500	$\times 10^4$ / μ L	430.4	35.6	439.8	36.6	0.090
ヘモグロビン	男性: 13.5-17.5 女性: 11.5-15.0	g/dL	12.7	1.2	12.9	1.2	0.272
ヘマトクリット	男性: 39.7-52.4 女性: 34.8-45.0	%	40.2	3.6	42.0	3.2	0.002 *
血小板数	14.0-34.0	$\times 10^4$ / μ L	24.2	6.3	25.3	5.9	0.165
MCV	85-102	fL	93.6	5.2	95.8	4.9	0.000 *
MCH	28.0-34.0	pg	29.6	2.0	29.4	2.1	0.136
MCHC	30.2-35.1	%	31.6	0.8	30.7	0.8	0.000 *
好中球率	40.0-75.0	%	55.9	9.3	54.7	10.0	0.452
リンパ球率	18.0-49.0	%	35.9	9.3	36.7	9.9	0.588
単球率	2.0-10.0	%	4.8	1.0	4.5	1.0	0.176
好酸球率	0.0-8.0	%	2.7	2.0	3.3	2.8	0.170
好塩基球率	0.0-2.0	%	0.7	0.4	0.8	0.4	0.063
好中球数	-	/ μ L	2554.0	922.7	2757.2	815.8	0.113
リンパ球数	-	/ μ L	1548.9	371.1	1834.7	603.6	0.020 *
単球数	-	/ μ L	214.2	70.4	227.2	68.5	0.305
好酸球数	-	/ μ L	123.0	110.9	178.2	194.2	0.075
好塩基球数	-	/ μ L	28.1	13.7	39.1	20.4	0.003 *
AST (GOT)	10-40	U/L	19.3	4.5	19.6	4.3	0.610
ALT (GPT)	5-45	U/L	14.5	6.9	14.8	7.1	0.725
γ -GT (γ -GTP)	男性: 80以下 女性: 30以下	U/L	24.4	18.4	25.3	23.0	0.542
ALP	100-325	U/L	181.1	59.7	178.1	64.2	0.505
LD (LDH)	120-240	U/L	177.2	24.7	177.5	21.1	0.937
LAP	男性: 45-81 女性: 37-61	U/L	52.1	12.2	54.1	14.9	0.148

検査項目	基準値	単位	摂取前		摂取後		P value
総ビリルビン	0.2-1.2	mg/dL	0.8	0.2	0.8	0.2	0.771
直接ビリルビン	0.0-0.2	mg/dL	0.1	0.0	0.1	0.0	0.329
間接ビリルビン	0.2-1.0	mg/dL	0.7	0.2	0.7	0.2	0.608
コリンエステラーゼ (ChE)	男性:234-493 女性:200-452	U/L	313.8	75.7	313.2	83.8	0.925
ZTT	2.0-12.0	U	6.6	3.1	6.5	2.8	0.633
総蛋白	6.7-8.3	g/dL	7.0	0.5	7.1	0.4	0.389
尿素窒素	8.0-20.0	mg/dL	11.9	2.6	12.2	3.5	0.739
クレアチニン	男性:0.61-1.04 女性:0.47-0.79	mg/dL	0.7	0.1	0.7	0.2	0.365
尿酸	男性:3.8-7.0 女性:2.5-7.0	mg/dL	4.6	1.3	4.7	1.5	0.853
CK	男性:60-270 女性:40-150	U/L	125.1	104.5	113.1	63.1	0.598
ナトリウム	137-147	mEq/L	142.1	1.5	142.7	1.8	0.110
カリウム	3.5-5.0	mEq/L	3.8	0.2	3.9	0.3	0.808
クロール	98-108	mEq/L	103.3	2.1	102.8	1.7	0.318
カルシウム	8.4-10.4	mg/dL	9.5	0.4	9.4	0.4	0.413
無機リン	2.5-4.5	mg/dL	4.0	0.9	4.8	0.9	0.000 *
血清鉄	男性:50-200 女性:40-180	µg/dL	108.1	39.8	101.0	37.2	0.329
血清アミラーゼ	40-122	U/L	77.7	20.7	78.7	23.5	0.682
総コレステロール	120-219	mg/dL	209.3	44.1	214.0	48.6	0.143
HDL-コレステロール	男性:40-85 女性:40-95	mg/dL	74.2	16.1	75.9	12.3	0.381
LDL-コレステロール	65-139	mg/dL	117.0	37.0	119.8	41.0	0.250
TG (中性脂肪)	30-149	mg/dL	89.6	58.0	85.1	49.4	0.415
遊離脂肪酸	0.10-0.90	mEq/L	0.6	0.3	0.6	0.3	0.710
グルコース	70-109	mg/dL	82.1	7.5	84.1	10.7	0.237
HbA1c (NGSP)	4.6-6.2	%	5.5	0.3	5.4	0.2	0.000 *
グリオアルブミン	12.3-16.5	%	14.1	1.0	14.1	1.0	0.863

測定値は平均値±標準偏差で示した。

摂取前後の比較は、対応のある t 検定（有意水準 5%）で評価した。プラセボ群と NTM048 群の群間比較は、平行性の検定および傾きの有意性が確認できた場合は共分散分析（*）で評価し、確認できなかった場合は Student の t 検定で評価した（有意水準 5%）。

Table 4-7 主観的健康感

A) プラセボ群

検査項目	摂取前	摂取4週間後	P-value
はっきりした理由はないが、疲れている	4.0 (2.8 - 4.3)	3.0 (2.0 - 3.3)	0.062
熱っぽい	1.0 (1.0 - 1.0)	1.0 (1.0 - 1.0)	1.000
理由がなく肌がかゆくなることがある	2.0 (1.0 - 3.3)	1.0 (1.0 - 2.0)	0.125
肌やくちびるが乾きやすい	3.5 (2.0 - 4.3)	2.0 (1.8 - 3.0)	0.008 *
鼻がつまりやすい	1.5 (1.0 - 2.0)	1.0 (1.0 - 2.0)	0.188
のどに痛みやかゆみを感じることもある	1.0 (1.0 - 2.0)	1.0 (1.0 - 1.3)	0.063
下痢や便秘ではないのに、お腹がすっきりしない	1.5 (1.0 - 2.0)	1.0 (1.0 - 2.0)	0.344
下痢をしている	1.0 (1.0 - 1.3)	1.0 (1.0 - 1.3)	1.000
便秘をしている	2.5 (1.0 - 4.0)	1.5 (1.0 - 3.0)	0.119

B) NTM048 群

検査項目	摂取前	摂取4週間後	P-value
はっきりした理由はないが、疲れている	4.0 (3.0 - 5.0)	3.5 (2.3 - 4.0)	0.086
熱っぽい	1.0 (1.0 - 2.0)	1.0 (1.0 - 1.0)	0.406
理由がなく肌がかゆくなることがある	2.0 (1.0 - 3.0)	1.0 (1.0 - 3.8)	0.864
肌やくちびるが乾きやすい	4.0 (2.0 - 4.8)	2.5 (2.0 - 3.0)	0.017 *
鼻がつまりやすい	2.0 (2.0 - 3.8)	2.0 (1.0 - 3.8)	0.404
のどに痛みやかゆみを感じることもある	2.0 (1.0 - 3.8)	1.0 (1.0 - 2.0)	0.066
下痢や便秘ではないのに、お腹がすっきりしない	2.0 (1.0 - 3.0)	2.0 (1.0 - 3.0)	0.956
下痢をしている	1.0 (1.0 - 1.8)	1.0 (1.0 - 2.0)	0.266
便秘をしている	2.0 (1.0 - 2.8)	1.5 (1.0 - 2.0)	0.322

各測定値は中央値（四分位範囲）で示した。接種前後比較は、Wilcoxon の符号付順位検定（有意水準5%）で評価した。

第 5 章

総合討論

本研究では、「食」の観点から人々の健康を維持する方法として、感染症などの外的要因の防御と免疫機能の低下などの内的要因の改善という、2つのアプローチにより研究を行った。まずは本研究の概要について以下に述べる。

第2・3章では、免疫機能が低い高齢者で重症化しやすいことが報告されている[86]インフルエンザに注目した。重症化を免れる有効な手段であるワクチンや抗インフルエンザウイルス薬に加えて、安全性が高く日常的に摂取可能な食品の提供を目指して研究をスタートした。126種類の植物抽出物を対象に細胞を用いてスクリーニングを実施し、カリンを見出した。本研究により、カリン抽出物のインフルエンザウイルス感染阻害効果は、型によらず有効であること、活性の高かった画分にはエピカテキン主体の高分子ポリフェノールが多く含まれていたことが確認された。また、その作用機構としては投与したカリン抽出物の濃度により、①ウイルス粒子に吸着することで細胞への感染を物理的に阻害する、②エンベロープ膜を傷つけることによりウイルス粒子の構造を破壊する、という2つのポイントが存在することが示唆された。

第4章では、インフルエンザウイルスなどの感染症を予防するために重要な免疫機能そのものの強化を目的として、*Leconostoc mesenteroides* NTM048 に注目した。NTM048 はマウスを用いた研究[27][28]により免疫賦活効果が期待されている乳酸菌である。本研究は、免疫機能がやや低下している成人健常者を対象に、4週間の無作為化二重盲検並行群間比較試験で実施した。研究により、NTM048 配合チョコレート摂取群において、免疫スコアが有意に上昇し、特にT細胞系の免疫が活性化していることが明らかになった。また同時に安全性について確認を行ったところ、NTM048 配合チョコレートは本研究の条件下では安全な食品であることが確認できた。

続いて、本研究の既存研究に対する位置づけと今後の展望について述べる。本研究で見出されたカリンは食経験が豊富であり、古くから鎮咳や去痰作用が知られている果実である。日本の気候下においては、カリンの栽培は容易であることから、玄関先にカリンの果実をおいてその香りを楽しむ、など日本人にとって身近な植物のひとつといえよう。本研究により、インフルエンザウイルスの型によらず感染阻害効果が示されたことから、毎年のように変異を起こすインフルエンザウイルス全般に効果が期待できる。本研究において、活性画分に多く含まれていた高分子ポリフェノールは、カカオ[87]や柿[88][89]、リンゴ[87]などにも含まれていることが報告されており、カリン限定的なものではない。先述通り、カリンは喉に対する抗炎症作用や鎮咳などに有効な漢方薬として知られており、これらの症状が起きやすい時季はインフルエンザが流行しやすい時季と一致していることから、インフルエンザウイルス感染予防に有望な植物だと考える。我々と同時期に Hamauzu ら[39]も、カリン中の高分子ポリフェノールがウイルスの吸着段階を阻害することを報告したが、電子顕微鏡観察によりウイルスのエンベローブ膜が傷つけられウイルス粒子の構造が破壊された様子が観察されたのは、本研究が初めてである。リンゴや柿の高分子ポリフェノール類においてもカリン抽出物と同様な活性がある可能性が高い。活性画分である CSD3 には高分子ポリフェノールが多く含まれていたが、ポリフェノール以外の成分が 40%程度占めていた。ポリフェノール以外に含まれている成分に関しては、糖含有量の測定などを通じて明らかにする必要があると考える。作用機序に関しては、カリン抽出物の処理濃度により、阻害ポイントが複数あることが明らかになったが、ウイルス合成段階における阻害効果検証試験に関しては課題が残る。本研究では、CSE50 の処理濃度は、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の 2 点で実施しているが、濃度依存的にウイルスタンパク質の合成量がどのように変化する

るのか確認する必要がある。また、合成量の減少が確認された NS2 タンパク質については、NS2 遺伝子をターゲットして転写レベルにおいても産生量が減少しているのか確認すべきだと考える。

植物ポリフェノールの抗インフルエンザウイルス効果については多数報告されており [37-42, 60]、いくつかの研究ではヒトにおける検証がされている。Ide らにより約 750 名の高校生を対象に緑茶うがいのインフルエンザへの効果について検証された [91]。水うがいの統計学的な有意差は確認できなかったものの、高校生の遵守率が低かった影響も否定できず、今後規模を拡大することにより、効果を裏付けるような結果が得られるのではないかと期待されている。また、同様な研究として、紅茶エキスのうがいによるインフルエンザ予防効果が Iwata らにより検証されている [92]。297 名の健常者を対象に研究を行ったところ、紅茶エキスでうがいした群は何もしなかった群と比較して有意にインフルエンザ発症率が低かった。松本ら [93] は健常者 196 名を対象に 1 日あたりカテキン 378 mg とテアニン 210 mg をカプセルの形態で 5 か月間投与し、インフルエンザの発症率により評価したところ、有意な発症低下が確認できたことを報告している。カリン抽出物のヒトにおける抗インフルエンザウイルス感染阻害効果検証は現時点で実施していないが、今後検証していくべき課題と考えている。マウスを用いた研究では、カリン抽出物とインフルエンザウイルスが直接接触した時のみ、インフルエンザウイルスの感染性がキャンセルされたことから、最も効果的な摂取の方法はインフルエンザウイルスとカリンが近接していることであることが示唆された。しかしながら、マウスを用いた検証については検討すべき課題が多い。本研究においてはマウスにカリン 50% エタノール抽出物 CSE50 を 1 回経鼻投与を行うことで評価した。有効成分として考えられるポリフェノール類は、CSD3 (60% 含有率) と比較して CSE50 (13% 含有) は低い。ポリフェ

ノール以外の成分としてどのようなものが含まれているか同定は行っていないため、カリン中のポリフェノールのインフルエンザウイルス感染阻害効果を確認するためには CSD3 を評価試料として選択し再試験を実施する必要がある。また、「日常的に摂取可能な食品の提供」を考慮に入れると、薬のような 1 回投与の方法ではなく、混餌のように日常的に摂取させている投与方法での検討もすべきだと考える。これらの検討を終えたのちにヒトでの臨床試験へとステップアップする必要がある。

臨床試験における食品の形態については、飴やタブレットなど口腔内に長い時間滞留できるような形態の食品がよいと考える。現時点で最も効果的な方法は、ウイルスがヒトの上皮細胞に感染する前にカリン抽出物と接触し、感染性を失わせる方法だと考える。インフルエンザウイルスの感染リスクが高まるのは、通勤時などヒトとのフィジカルディスタンスが保たれない状況であり、そのような状況においては少しでも長くカリン抽出物が口腔内で滞留し、ウイルスの感染をブロックする必要があると考える。本研究では飴が口腔内に滞留する時間を想定し、10 分間カリン抽出物で処理して研究を実施したが、阻害効果の経時変化は確認していない。口腔内滞留時間は唾液量により大きく変化し、また唾液量は個人差が多い。経時的にカリン抽出物のインフルエンザウイルスに対する阻害効果を確認することで、多くの人が効果を得られるような食品の形態を設計していく必要があると考える。飴はすでにヒトでの臨床研究において効果が確認されている紅茶エキスによるうがいやカテキン・テアニン配合カプセルとは異なる食品形態であり、これらの食品と差別化が可能だと考える。

続いて、第 4 章の NTM048 配合チョコレート免疫賦活効果について言及する。本研究の主要評価項目として Hirokawa らが考案した免疫力スコアを採用している。特定保健用食品制度が 1991 年に始まり、2015 年には機能的

表示食品制度が開始したが、「免疫」の分野の表記取得は難しいといわれていた。その理由の一つとして、免疫系は T 細胞や B 細胞など複数のパラメータがかかわっており、それらが複雑に絡み合っているため、主要評価項目の設定が難しいことが挙げられる。Hirokawa らが考案した免疫力スコアは、過去の健康診断により得られた大量のデータをもとに主要な免疫系のパラメータ 8 種を 3 段階にスコア化し、それを総合的に加算することにより算出できる。そのため、NTM048 配合チョコレートの免疫賦活効果を総合的に評価できると考え、本研究の主要評価項目に設定した。上記で算出された免疫力スコアをもとにさらに「免疫力グレード」に区分することが可能となる (5 段階)。本研究においては、免疫力スコアに有意な上昇が確認できたが、その平均値の免疫力グレードは「要観察圏」から変化はなく、目標とする「安全圏」には到達しなかった。免疫力スコアを用いた臨床試験はいくつか報告されており、エキナセア抽出物 [94] や、野菜 100% 飲料 [95] もその一つである。これらのケースでも、本研究と同様、有意な免疫力スコアの上昇が確認されたものの、グレードは「要観察圏」に分類され、摂取前と比較して変化はなかった。これらの食品と同様、NTM048 配合チョコレートの免疫賦活効果は緩やかなものであると考える。本研究では摂取 4 週間での免疫賦活効果の検証だが、より長い期間摂取した場合、どのような効果がもたらされるのか非常に興味深い。

副次評価項目としては様々な免疫パラメータを評価した。本研究では $CD4^+$ T 細胞などの T 細胞系の増殖、また前後差は確認できなかったものの対照群と比較して有意な B 細胞の増殖などが確認された。先行研究 [27] [28] を考慮すると、NTM048 により樹状細胞が刺激を受け、 $CD4^+$ T 細胞が増加し、その結果として B 細胞が活性化、IgA が産生される可能性が考えられる。本研究においては、サイトカインや Th 細胞産生量を測定していないため、詳細なメ

カニズムは解明できない。今後これらのパラメータを評価することで詳細なメカニズムの解明が望まれる。

また、T細胞系が増殖したことにより、腸内細菌叢への影響についても評価する必要がある。健常者 10 名を対象に、サラシア属植物抽出エキスを 4 週間摂取すると、ナイーブ T 細胞の増加と T 細胞増殖能の向上が確認されると同時に、大腸内で *Bifidobacterium* 属が増え *Clostridium* 属が減少したという報告がある [96]。NTM048 配合チョコレートを摂取することで腸内細菌叢にどのような影響をあたえるかどうか検証することは非常に興味深い。

この研究への参加者は 21 歳から 69 歳であった。一般的に、免疫機能がピーク時の半分以下まで低下するのは 40 歳以降であり [83]、特に高齢者における免疫機能の低下が問題となっている。従って免疫機能が著しく低下する高齢者を対象に再度調査を実施することは非常に有用であると考えており、今後実施していきたい。また、本研究の男性の参加者は、対照群 20 名中 3 名、NTM048 チョコレート摂取群 22 名中 5 名であり、男性の参加者が少なかった。免疫機能の低下には性差による違いが報告されている [83][97] ため、男性の割合を増やす必要があると考える。本研究により NTM048 チョコレートの安全性が確認され、免疫機能が低下している健常者の免疫機能を上げる効果が期待できることが明らかになったため、今後、評価対象者をひろげることにより、より健康寿命の延長に貢献していきたい。

最後に評価試料とした食品の形態について言及する。乳酸菌を配合した製品は数多く存在しているが、ヨーグルトをはじめとする多くの製品では低温で保存する必要がある。本研究では、NTM048 をチョコレートに配合して試験食としており、常温での保管が可能のため、外出時に好きなタイミングで喫食が可能である。このような食品とともに、今まで以上に乳酸菌を日常的

に摂取できるような食品を開発し、人々の免疫機能がアップできるよう貢献していくことが企業としての使命だと考えている。

人類は英知を結集してワクチンや治療薬の開発に全力を注ぎ、次々と襲いかかってくる感染症に対して打ち勝ってきた歴史がある。が、耐性株の出現などウイルスは目まぐるしく変異をおこし、我々を今なお苦しめている。私の研究対象は機能性食品であり、これら感染症に対して劇的な効果は期待できない。一方で安全性が高く副作用も低いため、日常的な予防策の一つとして使用できる。私は、食の開発を通じて、人々の健康に少しでも貢献できるよう、今後も研究に精進していきたい。

引用文献

- 1) 厚生労働省プレスリリース, 令和元年簡易生命表概況
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/life/life19/dl/life19-15.pdf>
- 2) 総務省統計局, 統計からみた我が国の高齢者(65歳以上) - 「敬老の日」にちなんで-, 統計トピックス NO.126,
<https://www.stat.go.jp/data/topics/pdf/topics126.pdf>
- 3) 厚生労働省保険局, 令和元年度 医療費の動向
<https://www.mhlw.go.jp/content/12400000/000550870.pdf>
- 4) 内閣府令和元年度版高齢社会白書
https://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2019/zenbun/pdf/1s2s_01.pdf
- 5) Osterholm, M. T., Kelley, N. S., Sommer, A., Belongia, E. A.,
Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic
review and meta-analysis. *Lancet Infectious Diseases* **2012**, 12,
36-44.
- 6) 久根木康子, 徳村光昭, 三井俊賢, 井ノ口美香子, 内田敬子, 康井洋
介, 佐藤幸美子, 木村奈々, 外山千鈴, 前例観察による小中学校にお
ける 2014/2015 シーズンのインフルエンザ流行状況, ワクチン接種率
および有効率, 慶應保健研究, **2017**, 35(1), 059-062
- 7) Lamb, R. A., The influenza virus RNA segments and their
encoded proteins. In “Genetics of influenza viruses” edited
by Palese, P., and Kingsbury, D. W., Springer. **1983**, New York,
21-69.

- 8) 日本感染症学会提言「～抗インフルエンザ薬の使用について～」, 一般社団法人日本感染症学会 HP,
http://www.kansensho.or.jp/modules/guidelines/index.php?content_id=37
- 9) 国立感染症研究所, 抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス,
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/influ-resist/9293-flu-r20200109.html>
- 10) 大澤謙二, 安田英之, 森田博史, 竹谷孝一, 糸川秀治, カリン (Chaenomeles sinensis) 果実より単離されたトリテルペン及び β -sitosterol の抗菌活性及び抗溶血活性, *Natural Medicines* **1997**, 51 (4), 365-367.
- 11) 大澤謙二, 宮崎郁子, 今井啓二, 荒川勉, 安田英之, 竹谷孝一, カリン (Chaenomeles sinensis) 果実のヒアルロニダーゼ阻害効果及びラット肥満細胞からのヒスタミン遊離阻害効果について, *Natural Medicines* **1999**, 53 (4), 188-193.
- 12) Osawa, K., Arakawa, T., Shimura, S., Takeya, K., New Quinic Acid Derivatives from the Fruits of *Chaenomeles sinensis* (Chinese Quince), *Natural Medicines* **2001**, 55 (5), 255-257.
- 13) 富士経済プレスリリース第 18115 号「伸び緩やかも 2018 年、2019 年と拡大が続く健康志向食品市場を調査」
https://www.fuji-keizai.co.jp/press/detail.html?cid=18115&view_type=1.
- 14) Marteau P. R., de Vrese M., Cellier C. J., Schrezenmeir J., Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr.*, **2001**, 73, 430S-6S.
- 15) Perdigon G., Alvarez S., Rachid M., Aquero G., Gobbato N.,

- Immune system stimulation by probiotics. *J Dairy Sci.*, **1995**, 78(7), 1597-1606.
- 16) Kishino S., Ogawa J., Omura Y., Matsumura K., Shimizu S., Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria. *J Am Oil Chem Soc.*, **2002**, 79, 159-163.
- 17) Penedo L. A., Nunes J. C., Gama M. A., Leite P. E., Quirico-Santos T. F., Torres A. G., Intake of butter naturally enriched with cis9, trans11 conjugated linoleic acid reduces systemic inflammatory mediators in healthy young adults. *J Nutr Biochem.* **2013**, 24, 2144-2151.
- 18) Ebrahimi-Mameghani M., Jamali H., Mahdavi R., Kakaei F., Abedi R., Kabir-Mamdooh B., Conjugated linoleic acid improves glycemic response, lipid profile, and oxidative stress in obese patients. *Croat Med J.* **2016**, 57, 331-342.
- 19) Inoue K., Shirai T., Ochiai H., Kasao M., Hayakawa K., Kimura M., Sansawa H., Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *Eur J Clin Nutr.*, **2003**, 57, 490-495.
- 20) Hara Y., Yamamoto M., Ohni M., Nakajima K., Nakamura Y., Takano T. A., placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr.*, **1996**, 64, 767-771.
- 21) Hirata H., Nakamura Y., Yada H., Moriguchi S., Kajimoto O., Takahashi T., Hypotensive effects of sour milk in subjects with mild or moderate hypertension. *J Jpn Soc Nutr Food Sci.*,

- 2001, 54, 347-354.
- 22) Laino J., Villena J., Kanmani P., Kitazawa H.,
Immunoregulatory effects triggered by lactic acid bacteria
exopolysaccharides: new insights into molecular interactions
with host cells. *Microorganisms.*, **2016**, 4, 27.
- 23) Medrano M., Racedo S. M., Rolny I. S., Abraham A. G., Perez P.
F., Oral administration of kefir induces changes in the
balance of immune cells in a murine model. *J Agric Food Chem.*,
2011, 59, 5299-5304.
- 24) Makino S., Ikegami S., Kano H., Sashihara T., Sugano H.,
Horiuchi H., Saito T., Oda M., Immunomodulatory effects of
polysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp.
bulgaricus OLL1073R-1. *J Dairy Sci.*, **2006**, 89, 2873-2881.
- 25) Makino S., Ikegami S., Kume A., Horiuchi H., Sasaki H., Orii
N., Reducing the risk of infection in the elderly by dietary
intake of yoghurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii*
ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *Br J Nutr.*, **2010**, 104, 998-1006.
- 26) 牧野聖也, 池上秀二, 狩野宏, 伊藤裕之, 免疫調節多糖体を産生する
乳酸菌を活用した機能性, ヨーグルトの開発, 化学と生物, **2015**,
53(10), 709-714.
- 27) Matsuzaki C., Kamishima K., Matsumoto K., Koga H., Katayama
T., Yamamoto K., Hisa K., Immunomodulating activity of
exopolysaccharide-producing *Leuconostoc mesenteroides* strain
NTM048 from green peas. *J Appl Microbiol.*, **2014**, 116, 980-989.
- 28) Matsuzaki C., Hayakawa A., Matsumoto K., Katoh T., Yamamoto

- K., Hisa K., Exopolysaccharides produced by *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048 as an immunostimulant to enhance the mucosal barrier and influence the systemic immune response. *J Agric Food Chem.*, **2015**, 63, 7009-7015.
- 29) 全日本菓子協会 (ANKA) HP「菓子統計」<http://ankakashi.com/statistics.html>
- 30) Higuchi H., Yoshida K., Yonejima Y., Hisa K., Iwama Y., Osawa K., Effect of chocolate containing *Lactobacillus brevis* NTT001 on defecation. *Jpn Pharmacol Ther.*, **2017**, 45, 463-472.
- 31) Davinelli S., Corbi G., Righetti S., Sears B., Hugo H., Olarte H. H., Grassi D., Scapagnini G., Cardioprotection by cocoa polyphenols and ω -3 fatty acids: a disease-prevention perspective on aging-associated cardiovascular risk. *J Med Food.*, **2018**, 21(10), 1060-1069.
- 32) Scapagnini G., Davinelli S., Di Renzo L., De Lorenzo A., Olarte H. H., Micali G., Cicero A.F., Gonzalez S., Cocoa bioactive compounds: significance and potential for the maintenance of skin health. *Nutrients.*, **2014**, 6, 3202-3213.
- 33) 国立感染症研究所・厚生労働省, 今冬のインフルエンザについて (2018/19 シーズン) 第3部
<https://www.niid.go.jp/niid/images/idsc/disease/influ/fludocol819.pdf>
- 34) Castle, S.C., Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Phytother Res.*, 2010, 24(6), 810-816.
- 35) 大星航, 天川雅夫, 加藤亮二, 腸管免疫に対する β グルカン及び乳酸

- 菌の効果、医学検査, **2014**, 63(6), 673-679.
- 36) Lamb R.A. and Krug R.M., VIROLOGY 4th ed., **2001**, Capter 46, Fig. 15.
- 37) Cos P., Vanden Berghe D., De Bruyne T., Vlietinck A.J., Plant Substances as Antiviral Agents: An Update (1997-2001). *Curr. Org. Chem.*, **2003**, 7, 1163-1180.
- 38) Taguri T., Tanaka T., Kouno I., Antibacterial Spectrum of Plant Polyphenols and Extracts Depending upon Hydroxyphenyl Structure. *Biol. Pharm. Bull.*, **2006**, 29, 2226-2235.
- 39) Hamauzu Y., Yasui H., Inno T., Kume C., Omanyuda M., Phenolic Profile, Antioxidant Property, and Anti-influenza Viral Activity of Chinese Quince (*Pseudocydonia sinensis* Schneid.), Quince (*Cydonia oblonga* Mill.), and Apple (*Malus domestica* Mill.) Fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 928-934.
- 40) Kyoung K. H., Won K.J., Byoung S. K., Flavanone glycosides from *Citrus junos* and their anti-influenza virus activity. *Planta Media Letters*, **2001**, 67, 548-549.
- 41) Nakayama M., Suzuki K., Toda M., Okubo S., Hara, Y., Shimamura, T., Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antivir. Res.*, **1993**, 21, 289-299.
- 42) Song J.M., Lee K.H., Seong B.L., Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antivir. Res.*, **2005**, 68, 66-74.
- 43) Gaush C.R., Smith T.F., Replication and plaque assay of influenza virus in an established line of canine kidney cells.

- Appl. Microbiol.*, **1968**, 16, 588-594.
- 44) 飛田清毅, MDCK 細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離, 臨床とウイルス, **1976**, 4, 58-61.
- 45) Shimizu K., Mullinix M.G., Chanock R.M., Murphy B.R.,
Temperature sensitive mutants of influenza A/Udorn/72(H3N2)
virus. II. Genetic analysis and demonstration of
intrasegmental complementation. *Virology*, **1982**, 117, 45-61.
- 46) Riitta J. T., Phenolic Constituents in the Leaves of Northern
Willows: Methods for the Analysis of Certain Phenolics. *J.
agri. Food chem.*, **1985**, 33, 213-217.
- 47) Harper G. J., Airborne micro-organisms: survival tests with
four viruses. *J Hyg (Lond)*., **1961**, 59(4), 479-486.
- 48) 黒田 (澤井) 玲子, 佐々木裕, 西川智子, 黒田和道, 桜井孝納治, 山
本機生, 清水一史, カリン中ポリフェノール画分による新型インフル
エンザウイルスの感染抑制効果, 日本食品科学工学会誌, **2011**,
58(10), 496-498.
- 49) Sakai T., Ohuchi M., Imai M., Mizuno T., Kawasaki K., Kuroda
K., Yamashina S., Dual wavelength imaging allows analysis of
membrane fusion of influenza virus inside cells. *J Virol.*,
2006, 80(4), 2013-2018.
- 50) Palese P., Shaw M. L., Orthomyxoviridae: the viruses and their
replication. In: Knipe, D. M., Howley, P. M. (Eds.), *Fields
Virology*, **2007**, Lippincott, Williams & Wilkins, 1647-1689.
- 51) 川口敦史, 永田恭介, インフルエンザウイルスゲノムの機能制御と宿主
因子, ウイルス, **2006**, 56(1), 99-108.

- 52) Hay A. J., Lomniczi B., Bellamy A. L., Skehel J. J.,
Transcription of the influenza virus genome. *Biology*, **1977**,
83, 337-355.
- 53) Hatada E., Hasegawa M., Mukaigawa J., Shimizu K., Fukuda R.,
Control of influenza virus gene expression: quantitative
analysis of each viral RNA species in infected cells. *J*
Biochem., **1989**, 105, 537-546.
- 54) Siebert P. D., Chenchik A., Modified acid guanidinium
thiocyanate-phenol-chloroform RNA extraction method which
greatly reduces DNA contamination. *Nucleic Acids Res.*, **1993**,
21, 2019-2020.
- 55) 手塚雅勝, 鈴木弘美, 鈴木康夫, 原征彦, 岡田昌二, 茶葉カテキン類
のインフルエンザウイルスに対する不活化作用, 衛生化学, 1997,
43(5), 311-315.
- 56) Bui M., Wills E. C., Helenius A., Whittaker G. R., Role of the
influenza virus M1 protein in nuclear export of viral
ribonucleoproteins. *J Virol.*, **2000**, 74, 1781-1786.
- 57) Neumann G., Hughes M. T., Kawaoka Y., Influenza A virus NS2
protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent
interaction with hCRM1. *EMBO J.*, **2000**, 19, 6751-6758.
- 58) Yasuda J., Nakada S., Kato A., Toyoda T., Ishihama A.,
Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2
protein with virion matrix. *Virology*, **1993**, 196(1), 249-255.
- 59) Ward A.C., Castelli L.A., Lucantoni A.C., White J.F., Azad
A.A., Macreadie I.G., Expression and analysis of the NS2

- protein of influenza A virus. *Arch Virol.*, **1995**, 140, 2067-2073.
- 60) Palamera A.T., Nencioni L., Aquilano K., Chiara D.C.,
Hernandes L., Cozzolino F., Ciriolo M.R., Garaci E.,
Inhibition of influenza A virus replication by resveratrol. *J Infect Dis.*, **2005**, 191, 1719-1729.
- 61) Stegmann T., Membrane fusion mechanisms: the influenza
hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular
fusion. *Traffic*, **2000**, 1, 598-604.
- 62) Matlin K., Helenius A., Nuclear transport of influenza virus
ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes
export and inhibits import. *Cell*, **1991**, 67, 117-130.
- 63) Sugrue R. J., Hay A. J., Structural characteristics of the M2
protein of influenza A viruses: evidence that it forms a
tetrameric channel. *Virology*, **1991**, 180, 617-624.
- 64) Pinto L. H., Holsinger L. J., Lamb R. A., Influenza virus M2
protein has ion channel activity. *Cell*, **1992**, 69, 517-528.
- 65) Kuzuhara T., Imai Y., Takahashi H., Hatakeyama D., Echigo N.,
Green tea catechins inhibit the endonuclease activity of
influenza A virus RNA polymerase. *PLoS Currents*, **2009**, October
13, PPN 1052.
- 66) Kuzuhara T., Sei Y., Yamaguchi K., Suganuma M., Fujiki H., DNA
and RNA as new binding targets of green tea catechins. *J Biol
Chem.*, **2006**, 281, 17446-17456.
- 67) Haidari M., Ali M., Ward Cascells 3rd, S., Madjid M.,

- Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. *Phytomedicine*, **2009**, 16, 1127-1136.
- 68) Droebner K., Ehrhardt C., Poetter A., Ludwig S., Planz O., CYSTU052, a polyphenol-rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice. *Antiviral Res.*, **2007**, 76, 1-10.
- 69) 健康ライフサイエンス (HLS) HP, 免疫力低下の内部要因、
<http://www.h-ls.jp/inside10.html>
- 70) Mizumoto K., Kagaya K., Zarebski A., Chowell G., Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Euro surveill.*, **2020**, 25(10), doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.10.2000180.
- 71) CDC COVID-19 Response Team, Preliminary estimates of the prevalence of selected underlying health Conditions among patients with Coronavirus disease 2019-United States, February 12-March 28, 2020, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*, **2020**, 69(13), 382-386, doi: 10.15585/mmwr.mm6913e2.
- 72) ハルメク 生き方上手研究所調べ「新型コロナウイルスがシニア女性に与えた意識や行動の変化・影響を探る調査」2020年4月14日ニュースリリース
- 73) 辻典子, 納豆菌による樹状細胞の活性化と免疫抑制機能の解明, 平成 27 年度タカノ財団助成研究報告書.
- 74) Yasui H., Shida K., Matsuzaki T. and Yokokura T.,

- Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **1999**, 76: 383-389.
- 75) Rosenfeldt V., Benfeldt E., Nielsen S.D., Michaelsen K.F., Jeppesen D.L., Valerius N.H. and Paerregaard A., Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2003**, 111: 389-395.
- 76) Hammes W. P. and Hertel C., Family I. Lactobacillaceae, Bergey' s manual of systematic bacteriology., second ed., **2009**, 3, 465-511.
- 77) Barcelo A., Claustre J., Moro F., Chayvialle J.A., Cuber J.C., Plaisancié P., Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon., *Gut.*, **2000**, 46, 218-24.
- 78) Asahara T., Shimizu K., Nomoto K., Hamabata T., Ozawa A., Takeda Y., Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun.*, **2004**, 72, 2240-2247.
- 79) Fukuda S., Toh H., Taylor T.D., Ohno H., Hattori M., Acetate-producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters., *Gut Microbes.*, **2012**, 3, 449-454.
- 80) Higuchi H., Yoshida K., Nishimura S., Yonejima Y., Hisa K., Suzuki S., Oosawa K., Survival of *Lactobacillus brevis* NTT001 ingested via chocolate in the human gastrointestinal tract. *Jpn Pharmacol Ther.*, **2017**, 45, 967-973.

- 81) Hirokawa K., Utsuyama M., Ishikawa T., Kikuchi Y., Kitagawa M., Fujii Y., Nariuchi H., Uetake H., Sugihara K., Decline of T cell-related immune functions in cancer patients and an attempt to restore them through infusion of activated autologous T cells. *Mech Ageing Dev.*, **2009**, 130, 86-91.
- 82) Hirokawa K., Utsuyama M., Kitagawa M., Immunity evaluation method, immunity evaluation apparatus, immunity evaluation program and data recording medium having the immunity evaluation program. United States patent US 8815524 B2. **2014** Aug 16.
- 83) Hirokawa K., Utsuyama M., Hayashi Y., Kitagawa M., Makinodan T., Fulop T., Slower immune system aging in women versus men in the Japanese population. *Immun Ageing.*, **2013**, 10, 19.
- 84) Schmidt-Weber C.B., Akdis M., Akdis C.A., TH17 cells in the big picture of immunology. *J Allergy Clin Immunol.*, **2007**, 120, 247-254.
- 85) Noma T., Helper T cell paradigm: Th17 and regulatory T cells involved in autoimmune inflammatory disorders, pathogen defense, and allergic diseases. *Jpn J Clin Immunol.*, **2010**, 33, 262-271.
- 86) 上仲一義, 野崎周英, インフルエンザー予防と治療ー, 熊本保健科学大学研究誌, **2019**, No.16, 1-9.
- 87) Kamei M., Nihimura H., Takahashi T., Takahashi N., Inokuchi K., Mato T. and Takahashi K., Anti-influenza virus effects of cocoa. *J. Sci. Food Agric.*, **2016**, 96(4):1150-1158.

- 88) 米谷俊, 竹森久美子, 柿ポリフェノールの機能性, 日本食品科学工学会誌, **2016**, 63(7):331-337.
- 89) Ueda K., Kawabata R., Irie T., Nakai Y., Tohya Y., Sakaguchi T., Inactivation of Pathogenic Viruses by Plant-Derived Tannins: Strong Effects of Extracts from Persimmon (*Diospyros kaki*) on a Broad Range of Viruses, *PLoS One*, **2013**, 8(1)
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055343>.
- 90) 濱渦康範, 上田裕子, 伴野潔, リンゴ ‘つがる’ 果実の抗酸化能力と含有ポリフェノール成分の関係, 園芸学会雑誌, **1999**, 68(3).
- 91) Ide K., Yamada H., Matsushita K., Ito M., Nojiri K., Toyozumi K., Matsumoto K., Sameshima Y., Effects of Green Tea Gargling on the Prevention of Influenza Infection in High School Students: A Randomized Controlled Study. *Plos One*, **2014**, 16;9(5):e96373. 16.
- 92) 岩田雅史, 戸田眞佐子, 中山幹男, 辻山博之, 遠藤済, 高橋雄彦, 原征彦, 島村忠勝, 紅茶エキスのうがいによるインフルエンザ予防効果, 感染症学会誌, **1997**, 71(6), 487-494.
- 93) 松本圭司, 山田 浩, 田熊規方, 新納 仁, 豊泉樹一郎, 塩澤圭祐, 小菅和仁, 藤井貞子, 小野木恭子, 小川光子, 堤坂裕子, 緑茶成分の経口摂取によるインフルエンザ予防効果の検討: 成人ボランティアを対象としたランダム化二重盲検比較試験, 第31回日本臨床薬理学会年会(京都)、臨床薬理, **2010**, S212.
- 94) 藤井文隆, 橋本俊嗣, Verbruggen M., 鈴木直子, 椎塚詰仁, 山本和雄, エキナセアプルプレア製剤摂取による免疫機能賦活効果, 応用薬理, **2011**, 80(5), 79-87.

- 95) 株式会社伊藤園, ニュースリリース「野菜飲料摂取による免疫機能改善効果について確認」,
<https://www.itoen.co.jp/news/detail/id=22768>
- 96) Oda Y., Ueda F., Utsuyama M., Kamei A., Kakinuma C., Abe K., Hirokawa K., Improvement in Human Immune Function with Changes in Intestinal Microbiota by *Salacia reticulata* Extract Ingestion: A Randomized Placebo-Controlled Trial. *PLoS One.*, **2015**, 10(12), e0142909.
- 97) Reardon S., Infections reveal inequality between the sexes., *Nature*, **2016**, Jun 23;534(7608):447. doi: 10.1038/534447a.

論文の内容の要旨

機能性食品の抗インフルエンザウイルス効果および免疫賦活効果

氏 名 黒 田 玲 子

第 1 章 序論

総務省の発表（2020年）によると、総人口に占める65歳以上の高齢者の割合は28.7%に達し、過去最高を記録した。高齢化社会に伴い、医療費の増加が課題となっており、健康寿命を延ばすことが重要である。

このような状況下で注目されているのが、特定保健用食品などの食品群である。特定保健用食品は現在1,074品（2020年3月時点）が厚生労働省により表示許可・承認されており、その用途別構成比（2019年度）は、整腸作用が59.5%、中性脂肪・体脂肪関連が24.4%であった。機能性表示食品は機能性を表示できる食品として2015年に新たに加わった制度であり、人々が健康で活動することをサポートしている。特定保健用食品で許可されている機能に加えて、記憶力を維持するタイプやストレスや疲労を低減するタイプなど様々なタイプの食品が販売されている。2020年11月段階で3,412件の届出が出されている。

本研究は食を通じて「健康で生き生きとした生活」を提供することを目的として、感染症などの外的要因の防御と免疫機能の低下などの内的要因の改善という2つのアプローチにより実施した。まず、外的要因の防御と

して毎年のように流行するインフルエンザに注目し、126種類の天然植物抽出物を対象にスクリーニングを実施し、カリンを見出した。第2章、第3章では、その詳細な作用機構を明らかにした。第4章では、内的要因の改善として、乳酸菌 NTM048 を配合したチョコレートの免疫賦活効果を検証した。

第2章 カリン抽出物の抗インフルエンザウイルス活性

カリン (*Chaenomeles sinensis*) は、鎮咳や去痰作用といった薬効があり果実部はカリン酒などに加工されて食される植物である。本研究ではカリン50%エタノール抽出物 (CSE50) および CSD3 (CSE50 を DiaionHP20 カラムで精製した40%エタノール溶出画分) を用いて評価した。

MDCK (Mardin-Darby canine kidney) 細胞を用いたインフルエンザ感染中和効果試験を実施したところ、A/Udorn/307/72 (A型) および B/Johannesburg/5/99 (B型) に対し、5 µg/ml の CSE50 で処理すると、感染価が非処理ウイルスと比較して10%以下まで低下した。また、A/Chiba/1001/2009 (H1N1) pdm に対しては CSD3 を用いて効果を検証し、濃度依存的に感染阻害効果が確認された。つまり、カリン抽出物のインフルエンザウイルス感染阻害効果は型依存的ではないことが明らかになった。細胞レベルで効果が確認できたため、続いてマウスを用いて①CSE50投与後ウイルスを感染 (予防効果) ②ウイルス感染後、CSE50を投与 (治療効果) ③CSE50処理ウイルスを投与 (感染阻害効果) における効果に関して検証した。③のケースでは全頭生存が確認できたが、①②では効果が消失したことから、インフルエンザウイルスとカリン抽出物を直接作用させることが重要であると考察される。また、感染阻害効果が高かった画分を分析したところ、エ

ピカテキンを主体とした高分子ポリフェノールが多く含まれることが明らかになった。

第3章 カリン抽出物によるインフルエンザウイルス感染阻害機構の解明

インフルエンザウイルスの感染機構は、細胞への吸着、エンドソーム内の膜融合、感染細胞核内でのウイルス mRNA とゲノム RNA の合成、細胞質でのウイルスタンパク質合成、ウイルス粒子の形成・放出で成り立っている。本章では、様々な濃度のカリン分画物 CSD3 をウイルスに作用させ、各段階における感染阻害活性率を測定することで、詳細な感染阻害機構の解明を試みた。Hemagglutination (HA) 活性（吸着段階を模倣）及び Hemolysis 活性（膜融合段階を模倣）、MDCK 細胞への感染性を評価したところ、CSD3 濃度が 0.5 $\mu\text{g/ml}$ までの活性がほぼ一致していたが、1 $\mu\text{g/ml}$ では、非処理ウイルスと比較して HA 活性および Hemolysis 活性は 1/3 程度に減少しているのに対して、感染性は 1/100 まで減少していた。続いて、膜融合以降における阻害効果について、ウイルス RNA を定量することにより評価した。CSD3 で処理したウイルスを MDCK 細胞に吸着させ、細胞に結合した NPvRNA 量を回収・定量することにより細胞結合能力を評価したところ、1 $\mu\text{g/ml}$ では上記同様 1/3 程度の結合能力であった。ウイルス感染 2 時間後の mRNA は、一次転写により産生された mRNA 量を反映しており、非処理ウイルスと比較して 1/100 程度に減少しており、感染阻害率とほぼ一致した。以上の結果は、インフルエンザウイルスに対する阻害活性がカリン抽出物の濃度により大きく 2 期に分かれており、第 I 相（0~0.5 $\mu\text{g/ml}$ ）は吸着段階を、第 II 相（0.5~5.0 $\mu\text{g/ml}$ ）では膜融合段階以降の一次転写段階を阻害していることが示唆された。

電子顕微鏡観察により、カリン抽出物によりウイルスのエンベロープ膜が傷つけられ、内部が透過されていることが明らかになった。このエンベロープ膜の損傷が原因となり、膜融合から一次転写までの過程において何らかの欠陥が生じたことが示唆された。

第4章 *Leconostoc mesenteroides* NTM048 含有チョコレート の免疫機能改善効果

次に、免疫機能の改善効果を目的として本研究を実施した。NTM048 は、エンドウ豆から単離された植物由来の乳酸菌であり、多糖類（EPS）を菌体外に大量に産生する。マウスを用いた研究により、NTM048 を含む餌を2週間投与すると、糞便中のIgAレベルが上昇すること、またNTM048由来のEPSを3週間投与したマウスではCD3⁺T細胞およびCD4⁺T細胞が増加することがそれぞれ確認されているが、ヒトにおける免疫賦活効果に関しては検証されていなかった。

そこで、本研究では、免疫機能が低下している成人健常者の免疫機能に対する乳酸菌NTM048 (> 1.00×10⁹ CFU /日) 配合チョコレートの効果を評価することを目的とし、無作為化二重盲検並行群間比較試験を実施した。主要評価項目としては免疫カスコアを採用した。免疫カスコアは、T細胞数・CD4⁺T/CD8⁺T細胞比・ナイーブT細胞数・ナイーブ/メモリーT細胞比・B細胞数・NK細胞数・CD8⁺CD28⁺細胞数・T細胞増殖係数の8項目を過去の健康診断のデータベースをもとに3段階にスコア化し、算出できるものであり、総合的な免疫機能を測定することができる。被験食を4週間摂取すると、対照群と比較して、NTM048群の免疫カスコアの有意な上昇が観察された。また、本研究においてCD4⁺T細胞などのT細胞系の増加が確認された。CD4⁺T細胞はヘルパーT細胞（Th細胞）に属する細胞である。Th

細胞には、Th1 や Th2、Th17 が存在し、細胞性免疫、アレルギー性炎症、感染防御などの免疫学的作用をもらす。本研究において Th1 細胞が産生する INF- γ 量を測定したが、検出限界以下であった被験者が多く占めていたため有意な差は検出できなかった。

また、NTM048 配合チョコレートの安全性を確認するため、身体測定・理学検査、尿検査、末梢血液検査、アンケートによる自覚症状の調査を実施した。摂取 4 週間後の間に有意な変動が認められる項目が散見されたが、医師による診断では全員が健常者であると認められたことから、NTM048 配合チョコレートの 4 週間の継続摂取は本試験条件下では安全な食品であるといえる。

第 5 章 統括

カリン抽出物は、インフルエンザウイルスの型に関係なく感染増殖過程を阻害すること、またその阻害メカニズムはカリン抽出物の濃度により 2 期（第 I 相：吸着段階、第 II 相：膜融合段階から一次転写段階）存在することが示唆された。第 I 相における阻害活性と比較し、第 II 相における阻害活性は急激な感染率の低下を招いていた。カリン抽出物で処理するとウイルスのエンベロープ膜が傷つけられ、内部が透過することが電子顕微鏡の観察で示唆されており、カリン抽出物による処理によりウイルスゲノムが傷つけられ、劇的な感染低下を招くことが考察された。今後さらなる検証後に、ヒトにおける臨床試験を実施し、インフルエンザウイルス感染阻害効果に関して検証していくことを望む。

第 4 章では、植物性乳酸菌である NTM048 を配合したチョコレートを免疫機能が低めの健常者に 4 週間摂取すると免疫機能が活性化されること、また NTM048 配合チョコレートは安全な食品であることが明らかになった。

私の目標は、「食」を通じて人々の健康をサポートしていくことである。その目標を達成すべく、インフルエンザウイルスなどの外的要因から身を守るために「カリン」を見出し、そのインフルエンザウイルス感染阻害効果とそのメカニズムの解明を行った。続いて、身体の内的要因の強化という目的で「NTM048」が配合されたチョコレートの免疫賦活効果を検証した。今後も心身ともに健康となりうるような食品を提供できるよう研究に取り組んでいきたい。

以上のように、毎年のように流行し、免疫機能が低下している人が感染すると重症化する場合もあるインフルエンザウイルスに対して、感染を阻害する効果がある可能性があること、またその作用機構の解明、およびNTM048配合チョコレートを摂取することで免疫機能が活性化される可能性が高いことを見出した。「人々が生き活きと心身ともに健康な生活」が送れることを目指して、今後ともこれら機能性食品の研究が発展していくことを期待する。

(発表論文)

Sawai, R., Kuroda, K., Shibata, T., Gomyou, R., Osawa, K., Shimizu, K., Anti-influenza virus activity of *Chaenomeles sinensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, **2008**, 118, 108-112.

Sawai-Kuroda, R., Kikuchi, S., Shimizu, Y., Sasaki, Y., Kuroda, K., Tanaka, T., Yamamoto, T., Sakurai, K., Shimizu, K., A polyphenol-rich extract from *Chaenomeles sinensis* (Chinese quince) inhibits influenza A virus infection by preventing primary transcription in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, **2013**, 146, 866-872.

Kuroda, R., Higuchi, H., Yoshida, K., Yonejima, Y., Hisa, K.,
Utsuyama, M., Osawa, K., Hirokawa, K., Effects of chocolate
containing *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048 on immune function:
a randomized, double-blind, placebo-controlled trial., *Immunity &*
Ageing, **2018**, 15(29), <https://doi.org/10.1186/s12979-018-0139-2>

謝辞

2002年に株式会社ロッテに入社して以来、2018年までの17年間基礎研究部にて研究に従事してまいりました。社内外の多くの方々にご指導・ご鞭撻を賜りながら、その集大成として、博士論文を作成できたことは望外の喜びであり、ここで謝意を述べさせていただきます。

本論文を作成するのにあたり、ご指導・ご助言のみならず、いつも温かい激励をもって背中を押してくださいました東京大学大学院農学生命科学研究科の阿部啓子特任教授には心より感謝申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科「食品機能学」寄付講座の岡田晋治特任准教授には、本論文の文章構成をはじめとして様々にご指導を賜りましたことを深謝申し上げます。

日本大学医学部清水一史教授（現神戸大学大学院医学研究科附属感染症センター）と日本大学医学部黒田和道准教授（2017年度末にご退職）、日本大学医学部芝田敏克研究員には、カリンの抗インフルエンザウイルス効果の研究を行うにあたり、研究に対する姿勢を学ばせていただいた同時に、インフルエンザウイルスの研究手法、結果の解釈などご指導いただきましたことを厚く御礼申し上げます。

東京医科歯科大学の廣川勝昱名誉教授と東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科の宇津山正典博士には、健常者による免疫賦活効果試験の論文化において、ご指導賜りましたことを心より厚く御礼申し上げます。

株式会社ロッテ中央研究所の大澤謙二氏、吉田圭司郎氏、桜井幸治氏には、本研究テーマを与えてくださり、結果の解釈や論文作成指導などご指導いただきました。深く感謝申し上げます。株式会社ロッテの芦谷浩明氏、関哲哉

氏、小山寿之氏には学位取得にご理解いただき、いつも温かいご声援をいただきました。心より感謝申し上げます。食の機能性について研究をするにつれて、機能性食品をより多くの方に「おいしく」召し上がっていただくためにはどのようにしたらよいのか、解明すべく食の官能特性に興味を抱くようになりました。その希望はすぐに叶えられ、現在は食の官能特性とおいしさの研究を存分にさせていただいております。研究を自由に取り組むことができる素晴らしい環境に甘んじず、今後も研究に邁進する所存です。

最後に、学位取得を目指すことに賛同し、家事・育児のサポートをしながら精神的な面でも支えとなってくれた夫の直己と両親、また、そんな母をいつも応援してくれた長男拓己、長女一瑠、次男智己に心より感謝申し上げます。

令和3年3月

黒田 玲子