

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

日本において 2011 年以降、総人口は年々減少してきているが、65 歳以上の高齢者の人口は増えている。総務省の発表（2020 年 9 月 20 日）によると、総人口に占める高齢者の割合は 28.7%に達し、過去最高を記録した。高齢化社会に伴い、重要な問題の一つが医療費の増加である。2019 年度の医療費は前年度と比較して 2.4%増加し 43.6 兆円であり、健康寿命を延ばすことで医療費の増大を抑えることが重要である。

このような状況下で注目されているのが、特定保健用食品や機能性表示食品といった食品群である。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おり、1,530 件が現在販売中である。

本研究は、高齢者を含む全ての人々に、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実施した。まず、毎年のように流行するインフルエンザに注目して、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、インフルエンザウイルスの感染増殖に有効かつ食経験が豊富なカリンを見出した。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、インフルエンザウイルスだけでなくすべての感染症と戦うための免疫機能そのものに注目し、免疫賦活効果をもつ乳酸菌 NTM048 を配合したチョコレートが、免疫力低めの健常者に及ぼす効果を検証した。

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。126 種類の植物抽出物

のスクリーニングにより、カリン 50%エタノール抽出物 (CSE50) はインフルエンザウイルス感染抑制効果のある植物抽出物として見出された。本研究では 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。

まず、その効果が亜型依存的か否かを検討するため、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。結果として、A/Udorn/307/72 (A 型) および B/Johannesburg/5/99 (B 型) に対し、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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、新型インフルエンザウイルス (A/Chiba/1001/2009 (H1N1) pdm) に対しては CSD3 を用いて効果を検証し、濃度依存的に感染抑制効果が確認された。つまり、カリン抽出物のインフルエンザウイルス感染抑制効果は亜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① CSE50 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) ③ CSE50 処理ウイルスを投与 (感染抑制効果) 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、感染抑制効果が高かった画分を用いて、活性成分の同定を行ったところ、エピカテキンを主体とした高分子ポリフェノールが主成分であ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抑制機構の解明

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、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、詳細な感染抑制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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までの活性がほぼ一致していたが、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 期に分かれることを示唆している。第 I 相 (0~0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) では、細胞への結合能力の減少と感染阻害活性がほぼ一致していたため、このフェーズにおいては細胞への結合能力の減少が起因することが示唆された。第 II 相 (0.5~5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) では、膜融合段階以降の一次転写段階への阻害が起因していると考えた。

電子顕微鏡による観察において、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 の免疫力改善効果

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、グルコースとフルクトースを主成分とする多糖類 (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、免疫力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 ($> 1.00 \times 10^9$ 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、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力スコアを採用した。免疫力スコアは、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、総合的な免疫力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 群の免疫力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、制御性 T 細胞 (Treg) 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ち、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締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亜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：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。以上のようにメカニズムについては解明されつつあるため、今後さらなる検証を積んだ後に、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実証されることを望む。

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力が低めの健常者に 4 週間摂取すると免疫機能が活性化されること、また NTM 048 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、「すべての人が豊かなくらし」をおくるように貢献することである。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抑制効果とそのメカニズムの解明を行った。続いて、身体の内側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。上記の目標を達成するために、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、免疫力が低下している乳幼児や高齢者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、カリンは増殖を抑制し症状を緩和す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。「すべての人が生き生きとした心身ともに健康な生活」が送れる未来にむけて、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。