

【原 著】

ハトムギ反応生成物エキスの抗インフルエンザウイルス作用 Anti-influenza Virus Activity of Coix-seed Reactive Derivatives

永井栄美子¹, 奥田みずほ¹, 潘 凌風¹, 鈴木信孝², 許 鳳浩²,
滝埜昌彦³, 瀧川義澄³, 伊勢川祐二⁴, 榎本俊樹^{1,*}

Emiko NAGAI¹, Mizuho OKUDA¹, Lingfeng PAN¹, Nobutaka SUZUKI², Hoko KYO²,
Masahiko TAKINO³, Yoshizumi TAKIGAWA³, Yuji ISEGAWA⁴, Toshiki ENOMOTO^{1,*}

¹ 石川県立大学生物資源環境学部食品科学科

² 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科臨床研究開発補完代替医療学講座

³ アジレント・テクノロジー株式会社

⁴ 武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科

【要 旨】

目的：近年、インフルエンザウイルス (IFV) において薬剤耐性株が出現し始め、問題となっている。新たな IFV の予防法や治療法の開発を行うことを目的に、ハトムギ反応生成物 (Coix-seed Reactive Derivatives: CRD) エキスの抗 IFV 作用を検討した。

方法：MDCK 細胞に H1N1 A/Puerto Rico/8/34(PR8) 株を感染させ、CRD エキス含有培地で 24 時間培養した。24 時間後に上清のみを回収し、上清中のウイルス力価をフォーカス法により測定した。PVPP 処理により CRD エキス中のポリフェノールを除去し、除去前の CRD エキスとの抗 IFV 作用を比較した。

結果：CRD エキスは PR8 株の増殖を阻害した。また、Time of addition assay の結果、CRD エキスは IFV の吸着時を最も阻害していることが判明した。さらに、CRD エキスの PVPP 処理による検討から、ポリフェノールが有効成分である可能性が示唆された。

結論：CRD エキスは PR8 株に対して抗 IFV 作用を示し、さらに IFV の細胞への吸着阻害のみならず、IFV の増殖時においても

阻害作用を示した。また、CRD エキスの抗 IFV 作用にはポリフェノールが関与していることが示唆された。

【キーワード】

CRD エキス, 抗ウイルス作用, インフルエンザウイルス, ハトムギ

はじめに

インフルエンザは毎年世界的に流行を引き起こし、肺炎や脳症などの合併症により時には死に至る場合もあるため¹⁾、公衆衛生上も非常に重大な感染症である。この原因となるのがインフルエンザウイルス (IFV) であり、人に感染するウイルスは主に A 型、B 型、C 型の 3 タイプである。治療にはオセルタミビル、ザナミビル、アマンタジン、リマンタジンなどの抗ウイルス薬が使用されている。しかし、M2 イオンチャンネル阻害剤であるアマンタジンでは高確率で薬剤耐性株が出現し、ノイラミニダーゼ阻害剤であるオセルタミビルやザナミビルにおいても薬剤耐性株が出現し始めている²⁾。このため、インフルエンザに対する新たな予防法や治療法の開発が望まれている。

ハトムギ反応生成物 (Coix-seed Reactive Derivatives: CRD) エキスは、イネ科ジュズダマ属であるハトムギ (*Coix lachryma-jobi L. var. ma-yuen Stapf*) を原料とし、殻付きで

受理日：2017年6月28日

* 〒921-8826 石川県野々市市末松 1-308 石川県立大学生物資源環境学部食品科学科

Tel : 076-227-7220 Fax: 076-227-7410 E-mail : enomoto@ishikawa-pu.ac.jp

酵素処理を施し抽出したものである。この CRD エキスではヒトパピローマウイルスの感染で発症する尖圭コンジローマに対して有効であったという臨床報告がある³⁾。また、この他にも CRD エキスの抗腫瘍作用や抗炎症作用が報告されている⁴⁾。同様に、ハトムギにおいても抗腫瘍作用⁵⁾、抗炎症作用⁶⁾、抗ガン作用⁷⁾など多くの生理機能が報告されている。また、ハトムギ子実にはヨクイニン(漢方薬名)と呼ばれ、このヨクイニンの内服により、NK 細胞活性と MHC 非拘束性細胞傷害性 T 細胞の増強が確認されている⁸⁾。さらに、細胞傷害性リンパ球の活性を高めることで抗ウイルス作用を示す可能性が示唆されている⁹⁾。

このように、CRD エキスが抗ウイルス作用を有する可能性が示されており、IFV に対する効果も期待できる。しかし、ハトムギにおいては、ウイルスに感染させた細胞や動物を用いた検討はなされていない。そこで、本研究では、ハトムギ反応生成物である CRD エキスの *in vitro* における抗 IFV 作用を確認することを目的とした。また、CRD エキスがウイルス増殖のどの段階を阻害しているのか、および関与する活性成分についても検討を行った。

材料・方法

1. 試料の作成

CRD エキスは、株式会社 ALT より供与されたものを用いた。CRD エキスからの抽出液の調整は、粉末状の CRD エキスを蒸留水と混合し、濃度が 200 mg/ml となるように溶解することにより行った。抽出液はフィルター (pore size 0.2 μ m, Milipore, Billerica, MA) 滅菌を行い、実験に使用するまで -20°C で保存した。

2. 細胞およびウイルスの培養

Malin Darby Canine Kidney(MDCK) 細胞は 7 % fetal bovine serum (FBS) を含む Eagle's minimum essential medium (EMEM; Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO) で培養した。

H1N1 A/Puerto Rico/8/34 (PR8) 株は MDCK 細胞において培養し、実験に使用するまで -80°C で保存した。ウイルスストックのウイルス力価はフォーカス法により測定を行った。

3. ウイルス増殖阻害試験

ウイルスを希釈する際の培地は終濃度 0.4 % bovine serum albumin (BSA, fraction V; Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO) を含む EMEM を用いた。

ウイルスを培養する際の培地の作成には終濃度 0.4 % の BSA および 2 μ g/ml のアセチルトリプシン (Sigma-Aldrich) を含む DMEM を使用し、CRD エキスを DMEM で段階希釈した。

MDCK 細胞を 24 well プレートに播種し、 37°C の 5 %

CO_2 インキュベーター内で 24 時間培養し、血清不含の EMEM で 2 回洗浄後、実験に用いた。

洗浄後の MDCK 細胞に、希釈した PR8 株を 100 μ l; MOI 0.0001 の濃度で播種し、1 時間インキュベートした。インキュベート終了後、ウイルス溶液を取り除き、血清不含の EMEM で洗浄を行った。その後、CRD 溶液を含む DMEM を 500 μ l/well の量で添加し、 37°C の 5 % CO_2 インキュベーター内で 24 時間培養した。培養終了後、上清のみを回収し、回収した上清中のウイルス力価をフォーカス法により測定した。また、試料の IC_{50} 値は同じ試験を 3 回行い、平均値 \pm 標準偏差で示した。

4. フォーカス法によるウイルス力価の測定

ウイルスの希釈、および培養には終濃度 0.4 % の BSA を含む EMEM を用いた。

MDCK 細胞を 96 well プレートに播種し、 37°C の 5 % CO_2 インキュベーター内で 24 時間培養し、血清不含の EMEM で 3 回洗浄後、実験に用いた。

洗浄後の MDCK 細胞に、3 倍系列に段階希釈したウイルス溶液を 30 μ l/well の量で播種し、1 時間インキュベートした。インキュベート終了後、ウイルス溶液を取り除き、血清不含の EMEM で洗浄を行った。その後、BSA 含有の EMEM を 100 μ l/well の量で添加し、 37°C の 5 % CO_2 インキュベーター内で 18 時間培養した。培養後、培地を取り除き、Phosphate buffered saline (PBS) 溶液で洗浄を行い、エタノールで固定した。

感染細胞の染色には Mouse monoclonal anti-HA antibody (C179; Okuno, et al., 1993) および Horseradish peroxidase-labeled goat anti-mouse immunoglobulin G serum (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を用いた。各処理は室温で 40 分間行い、各処理毎に PBS で 2 回洗浄を行った。ペルオキシダーゼ反応は PBS に終濃度 0.01 % H_2O_2 および 0.3 mg/ml の 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を混合し、5 ~ 10 分間反応させた。その後、染色液を取り除き、水道水で洗浄し乾燥させた。染色した感染細胞は顕微鏡下でカウントし、ウイルス力価を算出した。

5. MTT assay

CRD エキスの細胞毒性は MTT assay により評価した。MTT assay には細胞増殖キット (Roche Diagnostics Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用い、キットの順に従い操作を行った。また、MTT assay は同じ試験を 3 回行い、平均値 \pm 標準偏差で示した。

6. Time of addition assay

CRD エキスを処理する時間帯を変えることで、CRD エキスがどの段階でウイルス増殖を阻害するのかについて検討を行った。

ウイルスを希釈する際の培地は終濃度 0.4 % BSA を含む EMEM を用いた。

ウイルスを培養する際の培地の作成には終濃度 0.4 % BSA および 2 μg/ml アセチルトリプシンを含む DMEM を用いた。

MDCK 細胞を 24 well プレートに播種し、37°C の 5 % CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養を行い、血清不含の EMEM で 2 回洗浄後、実験に用いた。

洗浄後の MDCK 細胞に希釈した PR8 株を 100 μl; MOI 0.01 の濃度で播種し、1 時間インキュベートした。その後、血清不含の EMEM で洗浄し、DMEM を加え 37°C の 5 % CO₂ インキュベーター内で 8 時間培養を行った。

ウイルス希釈時の溶液および培養液には、それぞれ終濃度が 1 mg/ml になるように CRD 溶液を加え各時間帯に処理した。添加した時間帯はウイルス吸着時 (-1 ~ 0 h)、ウイルス培養時 (0 ~ 8 h)、ウイルス吸着時および培養時 (-1 ~ 8 h) である。また、培養時に関しては、さらに 4 時間ごとに処理した場合 (0 ~ 4 h, 4 ~ 8 h) についても検討を行った。

8 時間の培養後、細胞を -80°C で凍結させ、凍結融解を 2 回繰り返した後、遠心分離 (1,200 rpm, 10 分) し、上清のみを回収した。回収した上清中のウイルス力価はフォーカス法により測定した。

7. Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) 処理によるポリフェノールの除去

CRD エキスに含まれるポリフェノールが抗 IFV 作用に影響を及ぼすかを検討するために、PVPP 処理により CRD エキス中のポリフェノールを除去し、抗 IFV 作用を比較した。

粉末状にした CRD エキスを蒸留水と混合し、濃度が 200 mg/ml となるように調製した。10 ml の CRD エキスに対して 1 g の PVPP を加え混合し、室温で 1 時間攪拌した。その後、溶液を濾過し、濾液を凍結乾燥した。凍結乾燥物の重量を測定後、再び蒸留水に溶解し、フィルター (pore size 0.2 μm, Milipore, Billerica, MA) 滅菌を行った。ポリフェノール除去後の CRD エキスは、ウイルス増殖阻害試験により抗 IFV 作用を評価した。また、試料の IC₅₀ 値は同じ試験を 3 回行い、平均値 ± 標準偏差で示した。

8. ポリフェノール量の測定

ポリフェノール量は、96 well プレートを用いたフォーリンチオカルト法¹⁰⁾に従い、一部を変更して行なった。30 μl の試料に同量のフォーリン試薬を加えて混合し、次いで 150 μl の 4 % 炭酸ナトリウム溶液を加え、30°C のインキュベーター内で 30 分間反応させた。吸光度の測定にはマイクロプレートリーダーを使用し、波長は 660 nm に設定した。没食子酸により作成した標準曲線からポリフェノール量を算出した。また、ポリフェノール量は同じ試験を 3 回行い、平均値 ± 標準偏差で示した。

9. 統計処理

結果の値は平均値 ± SD で示した。Time of addition assay における有意差検定は *Student's t-test* により行った。

結果

CRD エキスの抗 IFV 作用を確認するため、活性試験を行った。この試験ではウイルスを培養する際の培地に CRD エキスを混合し、ウイルスが減少した場合、抗 IFV 作用を有すると判断した。その結果、CRD エキスの濃度依存的にウイルスが減少した (Fig.1)。また、同様の試験を 3 回行い求めた IC₅₀ は 617 ± 175 μg/ml となった。さらに MTT assay により、CRD エキスは高濃度においても細胞毒性を示さないことが確認された (Fig.2)。

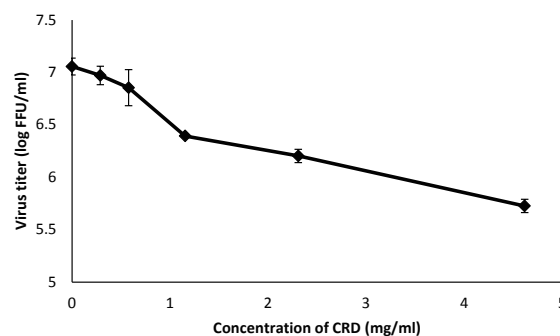


Fig.1 Anti influenza virus activity of CRD extract

MDCK cells were inoculated with A/PR/8/34 virus. The infected cells were cultured by DMEM containing CRD extract for 24 h. The virus titer were measured by focus-forming assay. Values are expressed as mean ± SD.

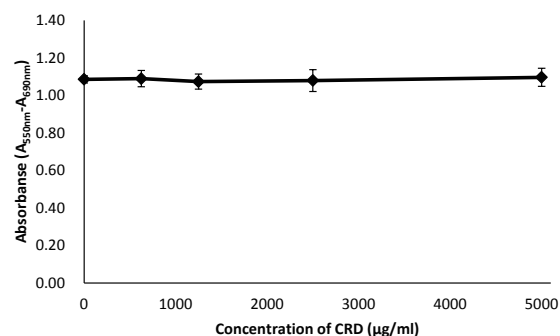


Fig. 2 Cytotoxicity test of CRD extract

MDCK cells were cultured by DMEM containing CRD extract for 24 h, and the cytotoxicity test was performed by MTT assay. Values are expressed as mean ± SD.

次にこの CRD エキスがウイルス増殖のどの段階を阻害しているのかについて検討を行うため、Time of addition assay を行った。この試験では、CRD エキスを処理する時間帯を変え、ウイルスが減少した時間帯を阻害ポイントと

判断した。その結果、CRD エキスはウイルスの吸着時 (-1 ~ 0 h) で特に強い阻害作用を示し、その阻害率は 94 % であった (Fig.3A)。さらにウイルス培養時の (0 ~ 8 h) でも阻害作用が認められ、その阻害率は 44 % であった (Fig.3A)。しかし、培養時に関しては 4 時間ごとに時間を区切って CRD エキスを処理した場合、阻害作用を確認することができなかった (Fig.3A)。また、オセルタミビルリン酸で同様の試験を行った場合、ウイルス培養時 (0 ~ 8 h) で阻害作用を示し、さらに培養時においても特に培養後期 (4 ~ 8 h) が阻害ポイントであった (Fig.3B)。これはオセルタミビルリン酸がノイラミニダーゼ阻害剤であるためだと考えられる。

PVPP 処理により CRD エキス中のポリフェノール量は約 25 % 減少した (Table 1)。また、PVPP 処理前後の CRD エキスの抗 IFV 作用を比較したところ、PVPP 処理後の CRD エキスでは阻害率が約 32 % 低下した (Table 1)。このことから、CRD エキスに含まれるポリフェノールは、PVPP に吸着・非吸着にかかわらず、抗 IFV 作用を有していることが示唆された。

考 察

本研究により CRD エキスは抗 IFV 作用を有することが判明した。また、Time of addition assay の結果より、CRD エキスの阻害ポイントは特にウイルスの吸着時 (-1 ~ 0 h) のみならず、培養時 (0 ~ 8 h) でも阻害作用を示すことが明らかとなった。オセルタミビルリン酸で同様の試験

を行った場合には、ウイルスの培養時でも、特に培養後期 (4 ~ 8 h) を阻害し、その他の時間帯では阻害作用は示さなかった。このことは、オセルタミビルリン酸がノイラミニダーゼ阻害剤であることと一致する結果である。これらの結果から CRD エキスとオセルタミビルリン酸は異なる作用メカニズムを有していることが判明した。

今回の結果より予測される作用メカニズムは大きく 2 つある。まず、ウイルス吸着時の阻害作用に関しては、CRD エキスに含まれる成分がウイルスの表面または細胞表面に吸着し、ウイルスと細胞の結合を物理的に阻害している可能性が考えられる。また、培養時の阻害作用に関しては、4 時間ごとに区切って CRD エキスを処理した場合には阻害作用を示さなかった。このことは、有効成分の吸収に時間を要するか、あるいは有効成分がウイルスに直接作用しているのではなく、細胞側に作用しウイルスの増殖を阻害している可能性がある。仮に CRD エキスが細胞側へ作用し、抗 IFV 作用を発揮していた場合、薬剤耐性株が出現しにくいことが予想される。

さらに、オセルタミビルリン酸のように有効成分が単一の場合、阻害ポイントが 1 箇所にとどまることが多い。しかし、CRD エキスでは、ウイルスの吸着時および培養時の両方で阻害作用を示した。このことは、ハトムギ CRD エキスに含まれる有効成分が単一ではない可能性を示唆している。

他の研究により茶やココアに含まれるポリフェノール類が抗 IFV 作用を示すことが報告されている^{11,12)}。CRD エキス中にもポリフェノールが含まれていることから、

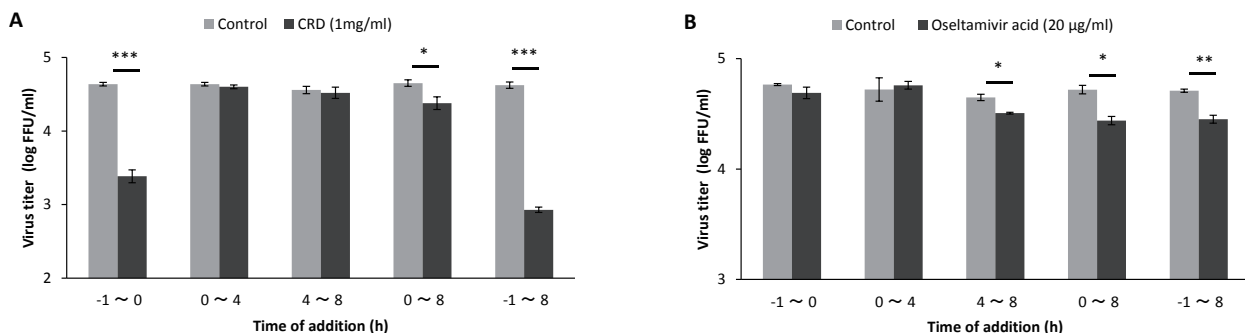


Fig. 3 Inhibition point in virus multiplication

The inhibition point was determined by time of addition assay. CRD extract or Oseltamivir acid (control) were added to each step (virus adsorption: -1-0 h, virus replication: 0-4, 4-8, 0-8 h, virus adsorption plus virus replication: -1-8 h). The virus titer were measured by focus-forming assay. Experiments were conducted separately at each time, and values are expressed as mean \pm SD. A: CRD extract, B: Oseltamivir acid. (P < 0.05); * (P < 0.01); ** (P < 0.001); ***

Table 1 Change of anti-influenza virus activity by PVPP treatment

	Polyphenol concentration (mg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)
Before PVPP treatment	1.72 \pm 0.07	617 \pm 175
After PVPP treatment	1.29 \pm 0.04	910 \pm 2

Polyphenol concentration and IC₅₀ were expressed as mean \pm SD.

PVPP 処理により CRD エキス中のポリフェノールを除去し、処理前後の抗 IFV 作用を比較した。その結果、ポリフェノール量の減少に伴い、抗 IFV 作用も低下した。このことから、ポリフェノール類が CRD エキス中の有効成分の 1 つである可能性が高い。しかし、PVPP 処理によるポリフェノールの除去率はわずか 25 % であり、処理後の CRD エキスに約 75 % のポリフェノールが残存している。また、処理後の CRD エキスにおいて、抗 IFV 作用は低下したものの、阻害率は約 32 % しか下がっていない。PVPP はフラボノイド系のポリフェノールと結合率が高いことが報告されている¹³⁾。したがって、CRD エキス中に存在する多くのポリフェノールは、非フラボノイド系であると考えられる。これらの結果から、CRD エキス中には、PVPP に吸着・非吸着にかかわらず、抗 IFV 作用を有するポリフェノールの存在が示唆された。

結 論

今回行った *in vitro* における研究では、CRD エキスはウイルスの吸着時および培養時の両方で抗 IFV 作用を示した。さらに現在、主要な抗 IFV 薬として使用されているオセルタミビルリン酸とは異なる作用メカニズムを有すると考えられた。なお、CRD エキスの安全性はラットやヒトにおいてすでに確認されており^{14,15)}、今後、実験動物やヒトでの研究が望まれる。

PVPP を用いた評価から、CRD エキス中の主要な有効成分は、ポリフェノールであることが示唆された。今後は抗 IFV 作用を有するポリフェノールの同定など、より詳細な成分分析が必要である。

以上より、CRD エキスは、インフルエンザの新たな予防法または治療法の開発において、非常に有用な食品であり、さらなる研究の発展が望まれる。

助成元

本研究の一部は石川県立大学地域貢献プロジェクトの支援により実施した。記して謝意を表す。

参考文献

- 1) Morishita T, Togashi T, Yokota S, et al. Encephalitis and Encephalopathy Associated with an Influenza Epidemic in Japan. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 512-517.
- 2) Timothy C. M. Li, Martin C. W. Chan, Nelson Lee. Clinical Implications of Antiviral Resistance in Influenza.

Viruses 2015; 7: 4929-4944.

- 3) 鈴木信孝, 川島拓也, 鈴木里芳ら. ハトムギ抽出エキスと葉酸併用療法により治癒した膣壁尖圭コンジローマの 1 例. 第 14 回日本補完代替医療学会学術集会 抄録集 2011;46.
- 4) 鈴木里芳, 徳田春邦, 鈴木信孝ら. ハトムギの抗腫瘍ならびに抗炎症作用に関する検討. *日本補完代替医療学会誌*. 2013; 10: 75-85.
- 5) Qu D, He J, Liu C, et al. Triterpene-loaded microemulsion using *Coix lacryma-jobi* seed extract as oil phase for enhanced antitumor efficacy: preparation and *in vivo* evaluation. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 109-119.
- 6) Seo WG, Pae HO, Chai KY, et al. Inhibitory effects of methanol extract of seeds of Job's Tears (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen*) on nitric oxide and superoxide production in RAW 264.7 macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2000; 22: 545-554.
- 7) Manosroi A, Sainakham M, Chankhampan C, et al. *In vitro* anti-cancer activities of Job's tears (*Coix lachryma-jobi* Linn.) extracts on human colon adenocarcinoma. *Saudi J Biol Sci* 2016; 23: 248-256.
- 8) Kaneda T, Hidaka Y, Kashiwai T, et al. Effect of coix seed on the changes in peripheral lymphocyte subsets. *Rinsho Byori* 1992; 40: 179-181.
- 9) Hidaka Y, Kaneda T, Amino N, et al. Chinese medicine, *Coix* seeds increase peripheral cytotoxic T and NK cells. *Biotherapy* 1992; 5: 201-203.
- 10) Dicko MH, Hihorst R, Gruppen H, et al. Comparison of content in phenolic compounds, polyphenol oxidase, and peroxidase in grains of fifty sorghum varieties from burkina faso. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 3780-3788.
- 11) Song JM, Lee KH, Seong BL. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Res* 2005; 68: 66-74.
- 12) Kamei M, Nishimura H, Takahashi T, et al. Anti-influenza virus effects of cocoa. *J Sci Food Agric* 2016; 96: 1150-1158.
- 13) 辻政雄. ポリビニルポリピロリドンを利用した白ワインの品質改善. *日本醸造協会誌*. 1997; 92: 472-477.
- 14) 林浩孝, 太田康之, 新井隆成ら. ハトムギ熱水抽出物のラット急性毒性試験. *日本補完代替医療学会誌*. 2009; 6: 105-110.
- 15) 新井隆成, 中出祐介, 川島拓也ら. 穀付ハトムギ熱水抽出エキスの臨床安全性試験. 第 13 回日本補完代替医療学会学術集会抄録集 2010;84.

ABSTRACT

Anti-influenza Virus Activity of Coix-seed Reactive Derivatives

Emiko NAGAI¹, Mizuho OKUDA¹, Lingfeng PAN¹, Nobutaka SUZUKI², Hoko KYO²,
Masahiko TAKINO³, Yoshizumi TAKIGAWA³, Yuji ISEGAWA⁴, Toshiki ENOMOTO¹

¹Department of Food Science, Ishikawa Prefectural University

²Department of Complementary and Alternative Medicine Clinical Research and Development,
Kanazawa University Graduate School of Medical Science

³Agilent Technologies Japan, Ltd.

⁴Department of Food Sciences and Nutrition, Mukogawa Women's University

Objective: We examined anti-influenza virus (anti-IFV) activity of Coix-seed Reactive Derivatives (CRD) extract.

Methods: H1N1 A/Puerto Rico/8/34 (PR8) strain was infected to Malin Darby Canine Kidney (MDCK) cells. The infected cells were cultured by medium supplemented CRD extract for 24 h, and the supernatants were harvested to analyze virus titer by focus-forming reduction assay. Polyphenols were removed by PVPP treatment, and anti-influenza virus activity was compared with normal CRD extract.

Results: CRD extract showed anti-IFV activity. In addition, CRD extract inhibited viral adsorption and replication. The study of CRD extract by PVPP treatment suggested that polyphenols are the main active component.

Conclusion: This study revealed that CRD extract has anti-IFV activity against PR8 strain. The mechanism of action was inhibited viral adsorption and replication. It was also suggested that anti-IFV activity of CRD extract is due to polyphenols.

Key words: CRD extract, anti-viral activity, influenza virus, *Coix lachryma-jobi*