

研究代表者

所属・職・氏名 和歌山県立医科大学・保健看護学部・講師・池田 敬子

共同研究者

所属・職・氏名 和歌山県立医科大学・保健看護学部・教授・鈴木 幸子
和歌山信愛女子短期大学・特任教授・小山 一
和歌山信愛女子短期大学・講師・西出 充徳

研究課題名

和歌山県産農作物に由来する物質のもつ抗ウイルス活性の探索および
ウイルス感染制御への応用に向けた基礎的研究

要旨

和歌山県産農作物から抽出液を調製し、多くの抗ウイルス活性やウイルス不活化活性をもつものがあることを見出した。農薬などの影響を避けるために、ハッキリ農薬の影響のない環境下で育てられたものとして入手できたトウガラシ類(これまでの解析において顕著な抗ウイルス作用を見出されていた)について、複数の品種と複数の個体から試料を調製し解析した結果、個体差や品種差を超えて普遍的なウイルス不活化活性が確認された。

梅干し製造の副生物から精製されたウメ酢ポリフェノールについても、そのウイルス不活化作用や抗ウイルス作用の機構について解析を進めた。ウメ酢ポリフェノールが DNA ウイルスであるヘルペスウイルスに対しても RNA ウイルスであるインフルエンザウイルスに対してもウイルス感染後の初期過程に作用すること、また、それだけでなく、両ウイルスの感受性細胞への吸着段階にも作用することを見出し、ウメ酢ポリフェノールがウイルス感染において複数の過程でウイルス増殖を抑えることを明らかにした。しかし、細胞への 1 時間の前処理はウイルス感染に効果を与えなかった。

一方、ウメ酢ポリフェノールと協働的に作用してノロウイルスなど非エンベロープウイルスを不活化する化合物の探索については、アルコール類、界面活性剤、タンパク質変性剤などから候補化合物を選び、そのウイルス不活化様式の系統的かつ網羅的解析に加え、それらとの組み合わせで梅酢ポリフェノールと協働的にウイルス不活化する条件を探索したが見つけることはできなかった。唯一、微酸性アルギニン溶液が、ウメ酢ポリフェノールの水への溶解度を上げることによりそのウイルス不活化活性を 10 倍程度増強することを見出した。

さらに、実際の感染制御への応用に向けてのインビトロの解析として、皮膚や衣服、病院環境や生活環境を汚染したウイルスの“周囲のヒトへの伝播能”を定量的に解析し、実用化のための基礎データをとりつつある。

注) 用紙は A 4 版縦長横書きとし、研究成果報告書を 800 字程度に要約してください。

研究代表者

所属・職・氏名 和歌山県立医科大学・保健看護学部・講師・池田 敬子
共同研究者

所属・職・氏名 和歌山県立医科大学・保健看護学部・教授・鈴木 幸子
和歌山信愛女子短期大学・特任教授・小山 一
和歌山信愛女子短期大学・講師・西出 充徳

研究課題名

和歌山県産農作物に由来する物質のもつ抗ウイルス活性の探索および
ウイルス感染制御への応用に向けた基礎的研究

1 目的

我々は、「組織障害作用の少ない病原体不活化薬（消毒薬）が、単に環境の消毒だけでなく体表面や粘膜表面での感染防御薬として使える可能性を持ち、感染症の予防薬・治療薬として感染対策に用い得る」と考えて、食品成分や食品由来の化合物についてウイルス不活化活性（消毒活性）や抗ウイルス活性を探索してきた。これまでに抗ウイルス関係や製薬関係の国際誌への報文を介して学界に報告できたものも、没食子酸とそのアルキル誘導体、ビタミンCとその誘導体、コーヒーとその成分（カフェインやカフェ酸など）、アルギニンとその誘導体等々、多数ある。

多くの植物にとって微生物感染による変性や動物による食害を防ぐことはその生存に重要な意味を持つ。進化の過程で、感染や食害に対する抵抗のために、それぞれの植物が自分の組織中に微生物や動物に対して生理的作用を表わす成分を含む方向に進化することは容易に予想され、実際、トリカブトや朝鮮アサガオなどの有毒植物と呼ばれる一群の植物ではアルカロイドなどの生理活性物質を産生していることも知られている。先行研究において我々は、生理活性としてウイルス感染に対する作用に的を絞り、食用植物である和歌山県産農作物について解析を行ったところ、薬草・毒草として知られている植物のみならず食品として普通に摂食されている農作物にも、このような生理活性のあることを見出した。これまでの解析の中では、南高梅やトウガラシをはじめ幾つかの県産農作物の粗抽出液中に顕著な抗ウイルス活性やウイルス不活化活性を見出している。医食同源などという言葉に表されるように、人間の健康に食習慣ならびに食材の持つ意義は近年より強く認識されているが、主として栄養学的な立場や消化の視点からの検討であり、直接的な病原微生物に対する作用については想定されていない。

感染症対策は現下の一大社会問題である。一度は克服されたかに見えた感染症だが、新型インフルエンザなどの新興感染症はいうに及ばず、多剤耐性菌による結核など再興感染症などがたびたび新聞紙上をにぎわしている。環境の清浄化に伴って人々の警戒心が緩んでいる分、一たび、新興再興感染症が出現すると、さまざまな集団でパニックが引き起こされ、大きな社会問題とまでなる。感染症対策としては、抗生物質や抗ウイルス剤など

がすぐに論じられるが、これらの薬剤は特異性が高く効果的である反面、薬剤の標的が単一のタンパク質上の特異的部位であるため容易に薬剤耐性突然変異株の出現をみ、治療を困難にする。ことにインフルエンザに対して現下に行われているような予防投与などにおいては、薬剤投与が中途半端なレベルとなるため耐性ウイルスがより容易に出現すると予想される。

薬剤耐性変異株の出現に関して消毒薬は非常に大きな利点を持つ、消毒薬では、薬剤の標的分子と標的サイト（作用点）が多くの生体高分子（タンパク質とは限らない）にわたり特異性が低い。その結果、一つの消毒薬が①複数種の病原体に対して有効であることに加え、②原理的に耐性株を生じる可能性は考える必要がないという点である。

ウイルス感染症の治療に強い効果を持つ抗ウイルス薬が重要なことは自明であるが、感染症対策としては抗ウイルス薬を補完する役割を消毒薬は担いうる存在であり得る。しかし、一方、消毒薬の問題点は、その組織障害性にあり、人体に直接接触させるとどうしても肌荒れとかそれ以上の障害を起こす。我々は、効果的に病原体を不活化（消毒）し、かつ、組織障害作用の弱い消毒薬の開発を目指す時、食品成分は組織障害の少ない（安全性）という視点からは大きな利点を持つと考え、食品由来化合物の抗ウイルス作用を系統的に調べてきた。食品成分は、元来が食品であり、組織障害作用は弱いことが期待されるので、手荒れや塗布面の障害を考慮することなく使える可能性を考えてよい。

消毒薬の感染症対策における重要性と可能性を踏まえ、さらに地域産業の振興を考えて、今回、「和歌山県産農作物に由来する物質のもつ抗ウイルス活性の探索およびウイルス感染制御への応用に向けた基礎的研究」という課題を設定して研究を行った。

2 実施方法

2-1 出発材料

農作物については、JA紀の里直売所「めっけもん広場」にて生産者の氏名の特定できる商品からランダムに県産品を選んで購入し、解析の出発材料とした。農薬など実験結果に影響を与える処理を受けてないトウガラシ類については、三谷隆彦前近畿大学教授を介して、和歌山県農業試験場から、各品種について複数の個体から採取したものを入手した。梅酢ポリフェノールについては、和歌山産業振興財団より分与を受けた。

2-2 用いたウイルスと細胞

ウイルスへの作用の普遍性を検証するために、被検ウイルスとして単一のウイルス種だけでなく、ウイルス粒子構造および増殖様式の異なる3種類（ポリオウイルス1型Sabinワクチン株（以下、PV-1と略）、インフルエンザウイルスA₀PR₈（H1N1）株（以下PR8株）、と単純ヘルペスウイルス1型F株（以下、HSV-1と略））を主として用いた。同時に、必要に応じて他の類縁のウイルスも用いて、得られた結果の確認を行った。細胞も、ウイルス種に合わせて、ヒト由来のHEp-2細胞またはサル由来のVero細胞をPV-1とHSV-1の増殖実験（抗ウイルス作用の測定実験）に用い、イヌ腎由来のMDCK細胞をインフルエンザウイルスの増殖実験と感染価の測定に用いた。PV-1とHSV-1の感染価の測定にはアフリカミドリザル腎由来のVero細胞を用いた。細胞の培養には5%ウシ胎児血清（FBS）を含むイーグル最低必須培地（MEM）を用いた。

ウイルスの感染価の定量はプラック法にて行った。各ウイルス試料をダルベッコのリン酸緩衝塩類溶液（PBS）で10倍階段希釈し、その0.5mlを60mm-ディッシュに飽和状態（コンフルエント状態）にまで生やした単層培養細胞に接種し、室温で1時間ゆっくり機械的な振盪を行い、ウイルス吸着を行った。希釈液中にはウイルスの非特異的な不活化を抑えるために、インフルエンザウイルスに対する希釈液には0.1%ウシ血清アルブミン（BSA）を、HSV-1とPV-1に対する希釈液には0.5%FBSを加え、氷温にて保存した。ウイルス吸着後、未吸着のウイルスを吸引除去した後、インフルエンザウイルス感染MDCK細胞は0.6%寒天（Difco purified agar）とアセチル化トリプシン（6 μ g/ml）を含むMEM中で、PV-1とHSV-1とは0.5%FBSと0.6%メチルセルロースを含むMEM中で、それぞれ培養した。インフルエンザウイルスとHSV-1とは37 $^{\circ}$ Cで、前者は2日間、後者は3日間培養し、ポリオウイルスはワクチン株として温度感受性変異株なので35.5 $^{\circ}$ Cで28時間培養した。培養後、感染細胞を含むディッシュは10%ホルマリンと0.5%（w/v）クリスタルヴァイオレットを含む液で固定染色を行い、水洗・風乾後にプラックを目測により計数した。

2-3 披検試料（抽出液）の調製

生理活性を検査する試料（抽出液）の調製法は平成18年度大学等地域貢献促進事業の報告書で述べたが、以下に概略を図示する。得られた抽出液は-80 $^{\circ}$ Cで使用直前まで凍結保存し、解析に用いた。

購入した試料

↓ ① 水洗

↓ ② 選別

適当な部位

↓ ③ 細断

↓ ④ 摩り下ろす

↓ ⑤ ガーゼで濾す

濾したジュース

↓ ⑥ 低速遠心

↓ ⑦ 高速遠心

遠心上清

↓ ⑧ メンブレンフィルターによる濾過

濾過滅菌試料

↓ ⑨ 凍結保存

2-4 抗ウイルス作用（antiviral activity）の測定

ウイルス増殖に対する各試料の解析は以下のように行った。HEp-2またはVero細胞（HSV-1かPV-1に対する抗ウイルス作用を調べる時）またはMDCK細胞（インフルエンザウイルスに対する作用調べる時）を6穴ディッシュ（直径33mm）でコンフルエントになるまで単層培養する。それぞれのウイルスを細胞当たり5～10PFU（感染単位）になるよう加え、室温にて60分間ロッカープラットフォーム上で機械的に振盪してウイルス吸着操作を行う。吸着操作終了後、6穴ディッシュの各ウェル中のウイルス感染細胞に0.1%BSAを含むMEMを1.0mlずつ培養液として加え、さらに各ウェルに加える試料液量を変えて種々の

試料濃度になるように培養液に添加した後、各ウイルスが完全に増殖するのに必要な時間（HSV-1では16～24時間；インフルエンザウイルスでは12～18時間；PV-1では約14～20時間）培養した。

生じた子孫ウイルスの定量には、インフルエンザウイルスの場合には培養上清の一部をとり、その中に放出された感染性ウイルス量をブラック法で測定した。PV-1とHSV-1の場合には感染細胞を培養液と共に-80℃で2回凍結融解することにより感染細胞を温和な条件下で破碎し、細胞内ウイルスも細胞外に放出させた後、細胞融解液中の感染性ウイルスを総子孫ウイルス量としてそれぞれブラック法で定量した。

ウイルス増殖の抑制の程度は、感染細胞の培養液中に試料を加えなかった時に産生された感染性子孫ウイルス量を1とした時の、各濃度の試料液量を含む培養液で産生された子孫ウイルス量の相対比で表した。

2-5 ウイルス不活化作用（殺ウイルス作用 virucidal effect）の測定

容量 2 mlのプラスチック試験管（Assist tube）に各試料液を一定量加え、そこに試料の1/19量になるようにウイルス液を添加した。十分に混和した試料-ウイルス混液を氷上に30または60分間静置後、直ちに冷ウイルス希釈液（披検ウイルス種によって、FBSまたはBSAを添加したPBS）で10倍階段希釈し、各希釈液中の感染性ウイルス量をブラック法にて測定した。

不活化作用の程度は、試料液の代わりにウイルス希釈液をもちいたサンプルにおける残存感染性ウイルス量を1として、各試料液での残存感染性ウイルス量をそれに対する相対比で表した。

2-6 細胞障害活性（殺細胞作用 cytotoxic effect）の測定

6穴ディッシュにコンフルエントに単層培養した被検細胞を、種々の濃度に各試料液を加えた培養液（0.1%BSAを含むMEM）中で一定時間保温する。その後、一定量のトリプシン液を用いて単層培養から細胞を単細胞になるまで分散した後10%血清を含むMEMを一定量加え（トリプシン作用の停止と細胞の安定化のため）、単細胞分散液を調製する。ここから常法に従い、一定量の分散液をとり、これに同量のトリパンブルー液を加えて死細胞のみを染色し、総細胞数の中に占める死細胞数の割合を定量した。

2-7 衣服や手指、環境を汚染したウイルスの生存時間の定量

日常生活の中で常用してきた9種類の衣服を約1.5cm角に裁断して得られた布片を、121度のオートクレーブで15分間滅菌の後、約5日間乾燥機で乾燥させたものを試料として用いた。クリーンベンチ内で各試料をシャーレに並べ、10 μ lウイルス液を試料の中央部上に滴下して汚染し、シャーレのふたを開けたまま静置した。対照として試験管のガラス壁に直接10 μ lのウイルス液を滴下した。その後、0分（滴下直後）、5分、10分、15分、20分後に試料を試験管内に移し、試料からウイルスを回収するために1,000 μ lの0.1%BSA含有MEMを加えた後、ボルツテクスミキサーで5回攪拌した後、氷中に立てた。その後、適宜、ウイルス希釈液を用いて希釈し、回収できる感染性ウイルス量（感染価）をブラック法で測定した。

手指や環境の汚染の場合は、10 μ l ウイルス液を手指や器具上に滴下して汚染し、その後、経時的に0分（滴下直後）、5分、10分、15分、20分後に汚染部位を2,000 μ lのウイルス希釈液（0.1% BSA含有PBSなど）で洗い、汚染ウイルスをウイルス希釈液中に回収したのち、氷中に立てた。その後、適宜、ウイルス希釈液を用いて希釈し、回収できた感染性ウイルス量をブラック法で測定した。この研究については、和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得ている。

3 結果

研究課題は大きく以下の4つのテーマに分けられる。これらは、解析手技や目的が相互に関連し、並行して解析を行ってきた。

- (1) 和歌山県農作物のもつ抗ウイルス活性。
- (2) ウメ酢ポリフェノールについての解析。
- (3) ウイルス不活化に向けて梅酢ポリフェノールとの協働作用する化合物の探索。
- (4) 手指や生活環境を汚染したウイルスの伝播能についての定量的解析。

以下、申請書の記載順序にしたがい、結果を報告する。

(1) 和歌山県農作物のもつ抗ウイルス活性：

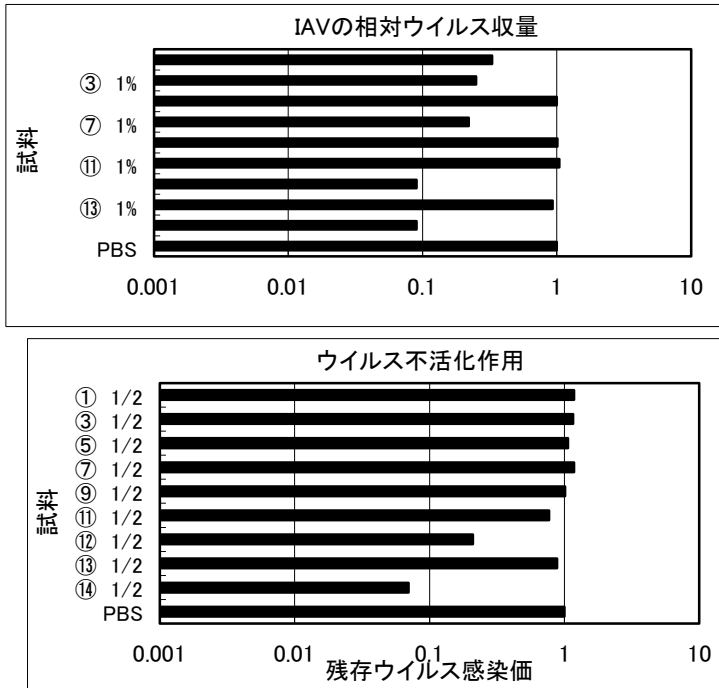
テーマ1は、和歌山県産農作物について、抗ウイルス活性やウイルス不活化活性の有無を定量的に明らかにし、科学的報告として十分なデータを得るというものである。既に、平成18年度の探索において、県内産の多くの農作物から得られた抽出液に抗ウイルス活性ならびにウイルス不活化活性が検出されているのを明らかにしているため、再度、JA直売店から生産者の分かった農作物を入手し試料として解析し、前回の結果を確認すると同時に、論文用にデータをそろえることを試みた。和歌山県産という点を確実にするため、JA直売店で生産者氏名の特定できるものを購入して解析を行ったが、このように商品になっているものでは、農薬処理など農産物の持つ抗ウイルス活性に影響を与える外部由来化合物が生産物表面や組織内に混入・含有されている可能性を除外できないことに気付いた。そこで、今回の報告から、それらの結果は省いた。この点に関しては、外部由来化合物の処理を受けていない農作物の入手方法を考える必要があり、県内産という枠との兼ね合いも考える必要がある。

そこで、和歌山県農業試験所から、農薬処理などを受けていない農作物を入手することを考えた。これまでの解析において顕著な抗ウイルス作用を示した和歌山県特産農作物の中からトウガラシを選び（シシトウだけでも生産高は全国3位）、複数の品種と複数の個体から抽出液を調製し、より詳細な解析を行った。

材料として入手できたトウガラシは、①ピーマン「京みどり」、②甘とう「甘とう美人」、③シシトウ-1、④シシトウ-2、⑤「伏見甘長」、⑥シシトウ-3、⑦「ネゴロ大唐」の7試料で、これらは県農業試験所で農薬など薬剤のかからない環境で育てられてきたものである。これら各々から果実部分（種と柄は除いた）と葉部分とを別々に試料を採取した。各試料ごとに重量を測定し、氷上で片刃かみそりで刻んだ。果実部分についてはそのまま抽出液を調製したが、葉部分については重量と同量のPBSを添加したのち抽出液を調製した。抽出液は、4重に重ねたガーゼで絞り、絞り液を卓上遠心機で冷却低速遠心（3,500 rpm,

10 分間) し、得られた遠心上清液をさらに冷却高速遠心 (12,500 rpm, 30 分間) して上清を以後の解析のための試料液とした。試料液は -80°C で凍結保存し、濾過滅菌はしないものを用い、インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス (HSV)、ポリオウイルスに対する抗ウイルス作用、ウイルス不活化活性、細胞毒性を調べた。

結果の一例として、インフルエンザウイルス (IAV) に対し 1% トウガラシ抽出液存在下でのウイルス収量ならびに 50% 抽出液中で 30°C 5 分間保温した時のウイルス感染価の減少を調べた結果を下の図に示す。



- ①ピーマン「京みどり」 実
- ③甘とう「甘とう美人」 実
- ⑤シトウ-1 実
- ⑦シトウ-2 実
- ⑨伏見甘長 実
- ⑪シトウ-3 実
- ⑫シトウ-3 葉
- ⑬ネゴロ大唐 実
- ⑭ネゴロ大唐 葉

感染細胞培養液に 1% という低濃度の抽出液添加でもインフルエンザウイルス増殖の抑制が幾つかのトウガラシ種で見られ、トウガラシの種類や個体を越えて普遍的に見られるものであることを示した。この活性は食用となる実の部分より廃棄される葉の部分で強いようであった。ウイルス不活化についても 30°C 5 分間という短時間処理ですら葉の部分からの抽出液には、不活化活性が見出された。処理時間をながくとると、不活化活性を示すトウガラシ種も増加し、実の部分からも活性が見出された (データは省略)。

次に、感受性の高いことが分かっている単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) への抗ウイルス作用の濃度依存性を調べた結果 (上段の抗 HSV) とウイルス不活化活性の有無をまとめたもの (下段の殺 HSV) を下表に示す。

10⁻²にまでウイルス収量またはウイルス感染価を減少させるのに必要な抽出液量 (単位は%)

通称	ピーマン 京みどり		ピーマン 甘とう美人		シトウ 1		シトウ 2		伏見甘長		シトウ 3		ネゴロ大唐	
	実	葉	実	葉	実	葉	実	葉	実	葉	実	葉	実	葉
抗 HSV	2.4	0.4	2.8	0.8	7.2	1.2	2.0	0.6	6.0	2.0	1.8	1.0	2.4	1.0
殺 HSV	(-)	(±)	(-)	(±)	(-)	15	(-)	(±)	(-)	25	(-)	(±)	ND	ND

(±); 20%以上で 10⁻¹程度まで不活化されるもの。 (-); >50%でも 10⁻²に達しないもの。

HSV の増殖は、感染細胞培養液へのトウガラシ抽出液の添加によって顕著に抑えられ、以前に得られた結果を確認するとともに、このウイルス増殖の抑制 (抗ウイルス作用) がトウガラシ内の種類や個体を越えて普遍的に見られるものであることを示した。抗ウイルス作用の発現に必要な濃度も低く、子孫ウイルス産生量 (ウイルス収量) を 100 分の 1 に下げするために必要なトウガラシ抽出液濃度は少ないものでは 0.4% から多いもので 7.2% であった。表から明らかなようにインフルエンザウイルスに対してと同様、どのトウガラシにおいても食用に供する実の部分より葉の部分により強い活性が見られた。一方、HSV の感染性に及ぼす効果 (殺 HSV-1) については、幾つかで多少のウイルス不活化活性が見られたものの、抗ウイルス活性ほど強い活性は見られなかった。

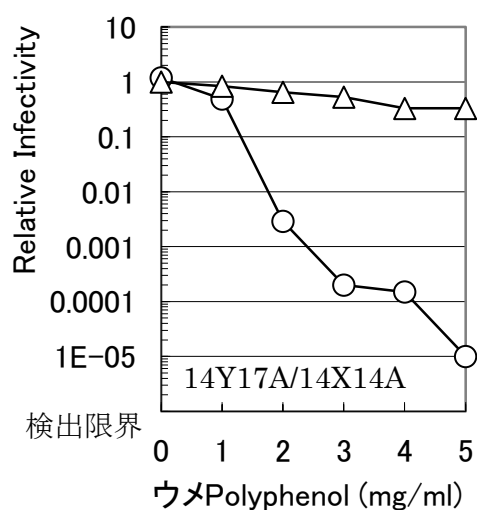
抗ウイルス活性についてはポリオウイルスでもインフルエンザウイルスや HSV と基本的に同じ結果が得られたが、ポリオウイルスに対しては殺ウイルス作用は見られなかった (データ省略)。

(2) ウメ酢ポリフェノールについての解析 :

テーマ 2 は、梅酢ポリフェノールの抗ウイルス活性について、その作用機構を明らかにするもので、ウメ酢ポリフェノールについては、すでに三谷らによって工業的製法まで確立しており、今回最も力を注いで解析を行った。HSV-1, PR8, PV-1 など各々について、以下の結果が出そろいつつあり、現在、HSV-1 についての報文作成にもかかっている。

(a) 梅酢ポリフェノールの殺ウイルス作用の溶媒依存性。

ウメ酢ポリフェノールのウイルス不活化活性 (殺ウイルス活性) については、既に明らかにしてきたが、ことにインフルエンザウイルスに対する殺ウイルス活性について調べると、強い溶媒依存性が見出された。等張で中性 pH の PBS 中の活性と蒸留水中での活性を較べたところ、下の図に示すように、いずれの溶媒中でもウイルスは濃度に依存して不活化されるものの、不活化の程度は PBS では強く抑制されていた。

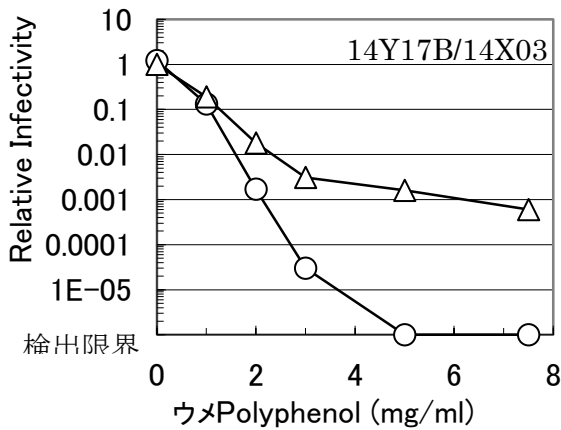


A 型インフルエンザウイルスを、種々の濃度の梅酢ポリフェノールを含む蒸留水溶液 (○) または、PBS (△) に加え、30℃で 20 分間保温した。
縦軸は保温後の残存感染ウイルス量、横軸は梅酢ポリフェノール濃度。

この結果は、梅酢ポリフェノール原液 (100 mg/ml) が酸性であり、蒸留水に溶かした場合には PBS の場合に比べて pH がより酸性になるためではないかと考えられた。

同様の解析を単純ヘルペスウイルス 1 型 F 株 (HSV-1) を用いて行った時の結果を下

の図に示す。



HSV-1 を、種々の濃度の梅酢ポリフェノールを含む蒸留水溶液 (○)、または、PBS (△)に加え、30℃で5分間保温した。

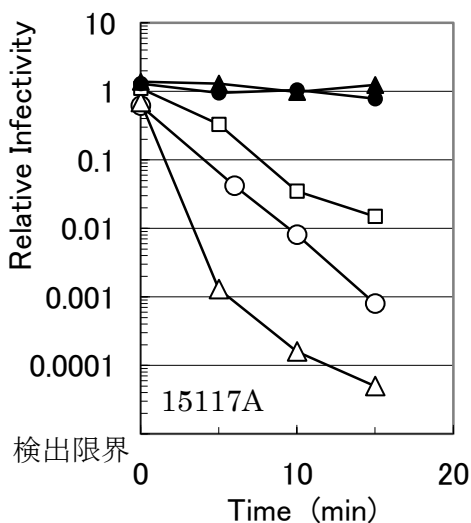
縦軸は保温後の残存感染ウイルス量、横軸は梅酢ポリフェノール濃度。

HSV-1 では、インフルエンザウイルスより梅酢ポリフェノールに対する感受性が高く、PBS 中でも蒸留水中でもポリフェノール濃度に依存して大きく不活化された。しかし、HSV-1 においてもインフルエンザウイルスの場合と同様に、殺ウイルス活性は PBS 中では蒸留水中より有意に抑制され、溶媒に対する依存性が示された。

(b) 酸性 pH によるウイルスの不活化。

梅酢ポリフェノールによるウイルス不活化が、ことにインフルエンザウイルスでは PBS 中で顕著に抑制されたことから、インフルエンザウイルスの不活化は梅酢ポリフェノール添加による溶媒 pH の酸性化の結果とも考えられた。梅酢ポリフェノールを蒸留水に溶かすと、1.0 mg/ml では pH 5.7、2.0 mg/ml では pH 5.0 であった。

梅酢ポリフェノールによるインフルエンザウイルスの不活化が梅酢ポリフェノール水溶液の酸性 pH の効果だけによるものではないことを明らかにするため、梅酢ポリフェノール水溶液での不活化のタイムコースを酸性 pH による不活化のタイムコースと比較した。



A 型インフルエンザウイルスを、10mM クエン酸緩衝液{pH 5.0 (□), pH 5.5 (●), pH 6.0 (▲)}、または梅酢ポリフェノール水溶液 {1.5 mg/ml (○), 2.0 mg/ml (△)}に加え、30℃で保温する。

0分、5分、10分、15分と経時的にサンプルを取り、感染性ウイルス量を定量した。

縦軸に残存ウイルス感染価を、横軸に保温した時間を示した。

上の図に明らかなように、pH 5.5 (●) または 6.0 (▲) の緩衝液中ではインフルエンザウイルスの不活化は見られなかったが、pH 5.0 (□) では時間とともに不活化された。

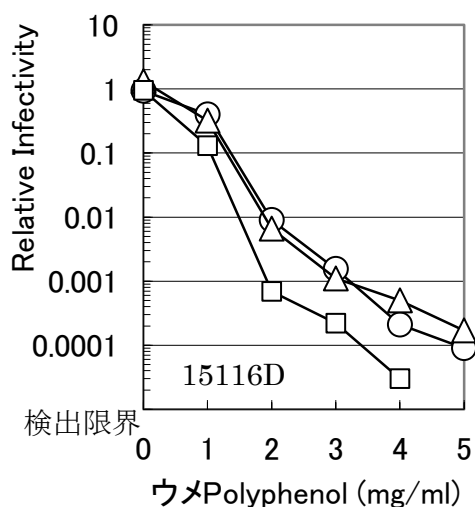
梅酢ポリフェノール存在下でも時間とともに不活化が見られ、2.0mg/ml での不活化(△)は pH 5.0 緩衝液での不活化(□)より顕著に速い速度で進んでいる。インフルエンザウイルスに対して見出された不活化は酸性だけによるのではない。インフルエンザウイルスが酸性条件下で不活化されることはよく知られているが、この結果は、梅酢ポリフェノールによるインフルエンザウイルスの不活化が単に酸性 pH によるものではなく、ポリフェノール分子としての作用にもよるものであることを示している。

(c) アルギニンによる梅酢ポリフェノールのウイルス不活化作用の増強。

梅酢ポリフェノールは最初に水溶液として抽出されて来ているので蒸留水に溶解すると予想され、事実、蒸留水もしくは蒸留水と PBS (Dulbecco のリン酸緩衝塩類溶液) との等量混合液、または、60%エタノール水溶液を用いて 100 mg/ml の梅酢ポリフェノール溶液を調製すると、機械的振盪により比較的容易に均一化し、可視的には溶けている。しかし、冷蔵庫に保存すると、いずれの溶液においても沈殿を生じることから、より安定な可溶化状態を作るために 0.2M アルギニン溶液 (pH 5.0) を用いて梅酢ポリフェノール溶液を調製した。

アルギニンを用いたのは、アルギニンはタンパク質構成アミノ酸であり、梅酢と同様に食品由来成分として安全性が高いことに加え、我々の先行研究から水に難溶性化合物の水への溶解度を高めることを明らかにしているからである。0.2M アルギニン水溶液を用いて梅酢ポリフェノールを溶かしたところ、明らかに可溶性を増し、この水溶液中では数日間の冷蔵庫保存でもほとんど沈殿物は見られなかった。

そこで、アルギニンによる殺ウイルス効果への影響を調べた。次の①～③の3系列の梅酢ポリフェノール試験溶液を調製した。①梅酢ポリフェノールを蒸留水に溶かした原液 (100 mg/ml) をさらに蒸留水に希釈して調製した希釈系列 (○)、②梅酢ポリフェノールを 0.2M アルギニンに溶かした原液 (100 mg/ml) を蒸留水に希釈して調製した希釈系列 (□)、③梅酢ポリフェノールを蒸留水に溶かした原液をさらに蒸留水に希釈して調製した希釈系列に②の系列と同じ濃度になるようにアルギニンをウイルス不活化試験直前に添加して調製した希釈系列 (△) である。ウイルスとしては感受性の高い単純ヘルペスウイルス 1 型を用いた。この結果を下図に示した。



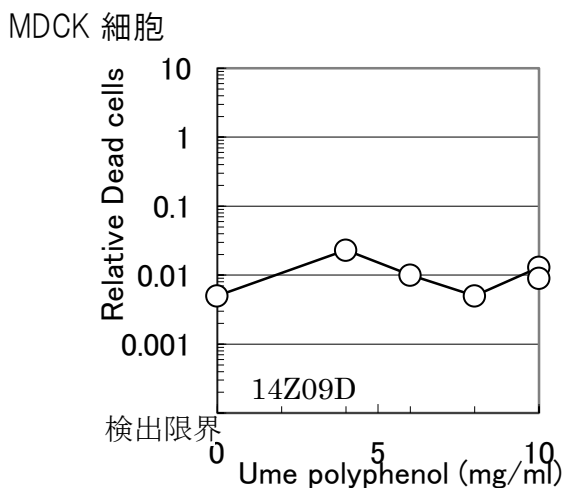
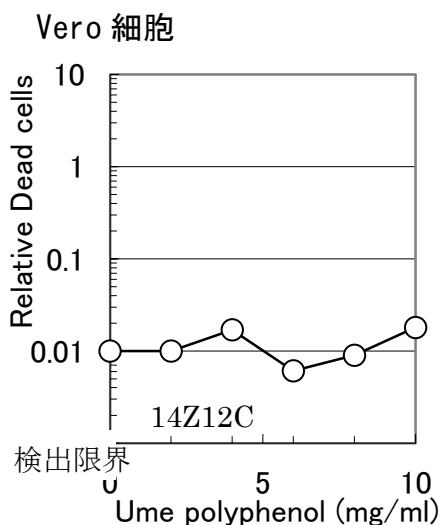
梅酢ポリフェノール原液を調製する時に、蒸留水を用いたもの(○, △)、または 0.2 M アルギニン水溶液を用いたもの(□)から希釈し、種々の濃度の梅酢ポリフェノールを含む試験液を準備した。蒸留水を用いた1系列(△)にはウイルス添加直前にアルギニン溶液を加えた。30℃で5分間保温した。

縦軸は保温後の残存感染ウイルス量、横軸は梅酢ポリフェノール濃度。

図から明らかなように、①の蒸留水に梅酢ポリフェノールを溶かしたものと③の不活化試験直前にアルギニンを加えたものとは全く変わらない不活化作用を示した（○と△）。このことは、この濃度のアルギニンの共存がHSV-1の不活化には影響を与えないことを示し、アルギニンは梅酢ポリフェノールに対して協働的な（synergistic）作用を持たないことを示している。さらに、この二者と②のアルギニンに溶かしたものをを用いた希釈系列（□）とを較べると、アルギニンに溶かしたものが約10倍強い不活化を示した。この結果から、アルギニンと梅酢ポリフェノールには協働的な作用はなく、アルギニンは梅酢ポリフェノールの溶解度を上げることにより梅酢ポリフェノール溶液中の活性ポリフェノール濃度を高めたものと考えられる。

(d) 梅酢ポリフェノールの細胞毒性：

今回、結果は示さないが、梅酢ポリフェノールはHSV-1やインフルエンザウイルスに対して抗ウイルス作用を示す。このウイルス増殖抑制が細胞変性の副次的な結果ではなく、梅酢ポリフェノールのウイルス増殖過程に対する作用であることを確認するため、梅酢ポリフェノールのVero細胞とMDCK細胞に対する障害作用を調べた。結果を下に示す。コンフルエントの単層培養細胞を10 mg/mlまでの濃度の梅酢ポリフェノールの含む培養液中で約24時間保温しているが、縦軸に示した総細胞数の中に占める死細胞数の割合は梅酢ポリフェノール濃度にかかわらず、約1%と未処理対照と変わらなかった。梅酢ポリフェノールの細胞毒性はこの条件下ではみられなかった。



コンフルエントにまで培養した Vero 細胞、または、MDCK 細胞の単層培養に、種々の濃度の梅酢ポリフェノールを含む 0.1%BSA 含有 MEM を加え、37℃で約 24 時間保温した。

トリプシンを用いて単細胞浮遊液を調製したのち、常法にしたがって色素排除法により死細胞と生細胞を定量し、総細胞における死細胞の割合を算出した。

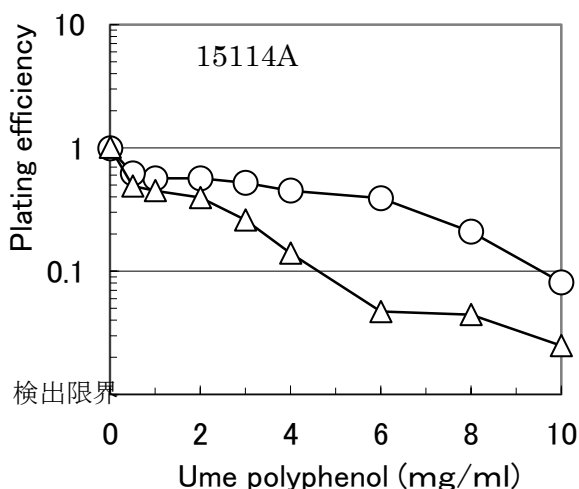
縦軸に死細胞の割合を、横軸に梅酢ポリフェノール濃度を示した。

(e) 梅酢ポリフェノールによるウイルス吸着過程に対する阻害。

ウイルスの増殖は、ウイルス粒子の細胞への吸着に始まって、ウイルスの細胞内への侵入 → ウイルスゲノム核酸の細胞内への放出 → ウイルスタンパク質の合成 → ウイルスゲノム核酸の複製 → 子孫ウイルス粒子の組立て → 子孫ウイルス粒子の細胞外への放出 と続く。梅酢ポリフェノールがインフルエンザウイルスの増殖を阻害することは既に報告しているが、その実験系においてはウメ酢ポリフェノールへの暴露は既にウイルス粒子が細胞に吸着し終えた状態の感染細胞の培養液中への添加と言うタイミングで行われ、上記ウイルス増殖過程のうち「ウイルスの細胞内への侵入とウイルスゲノム核酸の細胞内への放出」以後の細胞内ウイルス増殖過程へのポリフェノール作用しか調べられていない。そこで、ウイルスの感染増殖の最初のステップである“細胞へのウイルス吸着”段階への梅酢ポリフェノールの影響について、インフルエンザウイルスを用いて検討した。

一定量のインフルエンザウイルスを MDCK 細胞に感染させるが、感染直前に種々の濃度となるように梅酢ポリフェノール溶液をウイルス液に添加し、吸着効率に与える梅酢ポリフェノールの効果を調べた。梅酢ポリフェノールは吸着過程の完了後に除去し、以後のウイルス増殖過程が梅酢ポリフェノールのない状態で進行するようにし、その状態での感染巣の数（すなわち、プラックの数）を測定した。この条件下では、梅酢ポリフェノール存在下で細胞に吸着できたウイルスだけがプラックを作る。梅酢ポリフェノールは蒸留水に溶かしたもの（○）と 0.2M アルギニン水溶液（pH 5.0）に溶かしたもの（△）とを用いた。

下の図に示すように、低濃度の梅酢ポリフェノールの存在下でもインフルエンザウイルスの細胞への吸着は阻害されるが、濃度の上昇とともに阻害程度は大きくなる。また、阻害は、0.2M アルギニン水溶液（pH 5.0）に溶かした梅酢ポリフェノール溶液でより顕著に見られた。これらの結果は、インフルエンザウイルス感染において、梅酢ポリフェノールが細胞内増殖の始まる前のウイルス吸着の段階でもインフルエンザウイルスの感染を阻害できることを示している。また、この作用は非常に低濃度から見られる。同様の結果は、単純ヘルペスウイルスの Vero 細胞への感染においても見出された。

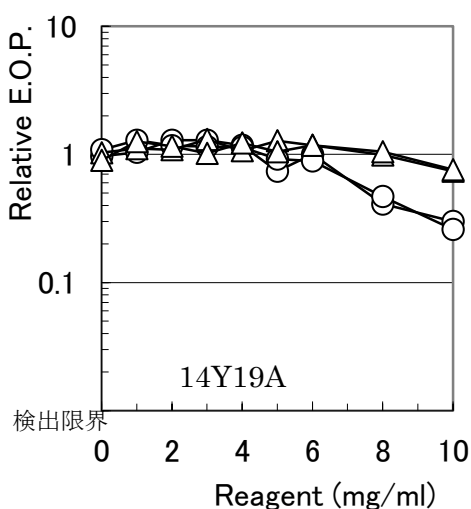


(f) 細胞への梅酢ポリフェノール前処理の効果。

ウイルス感染において、ウメ酢ポリフェノールが細胞表面へのウイルス吸着の段階でも作用することが分かったので、これがウイルス粒子への作用か細胞表面のウイルスレセプターへの作用かを明らかにするため、感受性細胞への梅酢ポリフェノール前処理実験を行った。

ウイルスとしてはHSV-1を、細胞はVero細胞を用いた。Vero細胞の単層培養を種々の濃度の梅酢ポリフェノールを含んだリン酸緩衝塩類溶液（PBS）もしくは培養液（MEM）中で37°C 60分間保温したのち、一定量のウイルスを感染させ、ウイルス吸着の効率（平板効率[E.O.P; plating efficiency]）に与える梅酢ポリフェノールの効果を調べた。梅酢ポリフェノールは蒸留水に溶かしたものをを用いた。

結果を下に示すが、PBS（○）中でもMEM（△）中でも、平板効率はウメ酢ポリフェノールの濃度の上昇につれわずかに下がるが、その変化は吸着課程への阻害に較べると小さく、前処理への効果はないと考えている。同様の結果は、インフルエンザウイルスでも得られた。PBS中では有意の低下がみられるように見える（MEMでは見られない）が、これは、PBSに高い濃度のウメ酢ポリフェノールを加え、そのPBS中で37°C60分間処理した細胞に、プラック形成のため低血清条件下で2~3日間培養するので、ディッシュ面の細胞層が荒れた状態となりプラックの計数が難しくなることを反映した結果であり、ウイルス吸着段階へのウメ酢ポリフェノールの効果ではないと考えている。



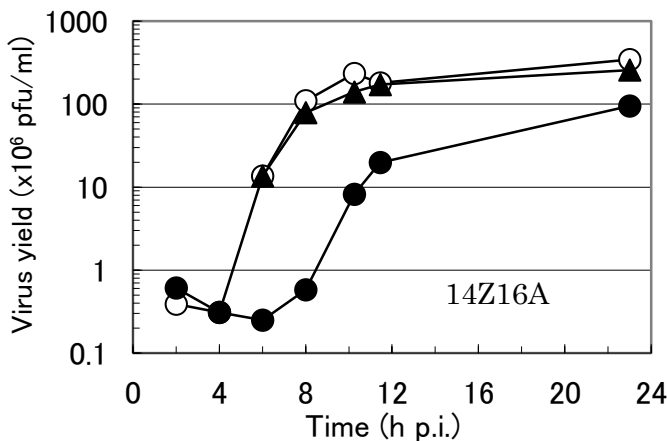
(g) 梅酢ポリフェノール存在下での一段増殖曲線

感染細胞内でのウイルス増殖に対してウメ酢ポリフェノールが与える影響を調べるためにVero細胞における単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)の一段増殖曲線を解析した。一段増殖では、実験系内の全ての細胞がウイルスに感染した状態でウイルス増殖が始まり、時間とともに進行し、HSV-1では約12~14時間後に完了する。ウメ酢ポリフェノールの存在しない条件下で感染後の各時刻に産生された子孫ウイルスの量を○で示した；感染細胞の培養液中にウメ酢ポリフェノールが存在した場合の子孫ウイルス合成は●で示した。

下の図に結果を示したが、梅酢ポリフェノールの存在下では(1)子孫ウイルスの出現は約4時間遅れるが(Eclipse periodの延長)、(2)一度出現し始めると、ほぼ正常の速度で子孫ウイルス合成が続き、(3)最終ウイルス収量は低下することが明らかとなった。

さらに、HSV-1 感染細胞内でのウイルスゲノム DNA の複製過程が完了している感染後 6 時間目にウメ酢ポリフェノールを加えた場合では (▲)、それ以後の子孫ウイルス産生にほとんど影響が見られなかった。

これらの結果は、ウメ酢ポリフェノール存在下における HSV-1 増殖が、ウイルスゲノム核酸の複製完了に至るまでの初期過程に主たる作用を表していることを意味する。先のウイルス吸着への結果と合せ考えると、ウイルス増殖の複数の過程（吸着過程ならびに増殖初期過程）に梅酢ポリフェノールが作用していることが明らかとなった。



(3) ウイルス不活化に向けて梅酢ポリフェノールとの協働作用する化合物の探索

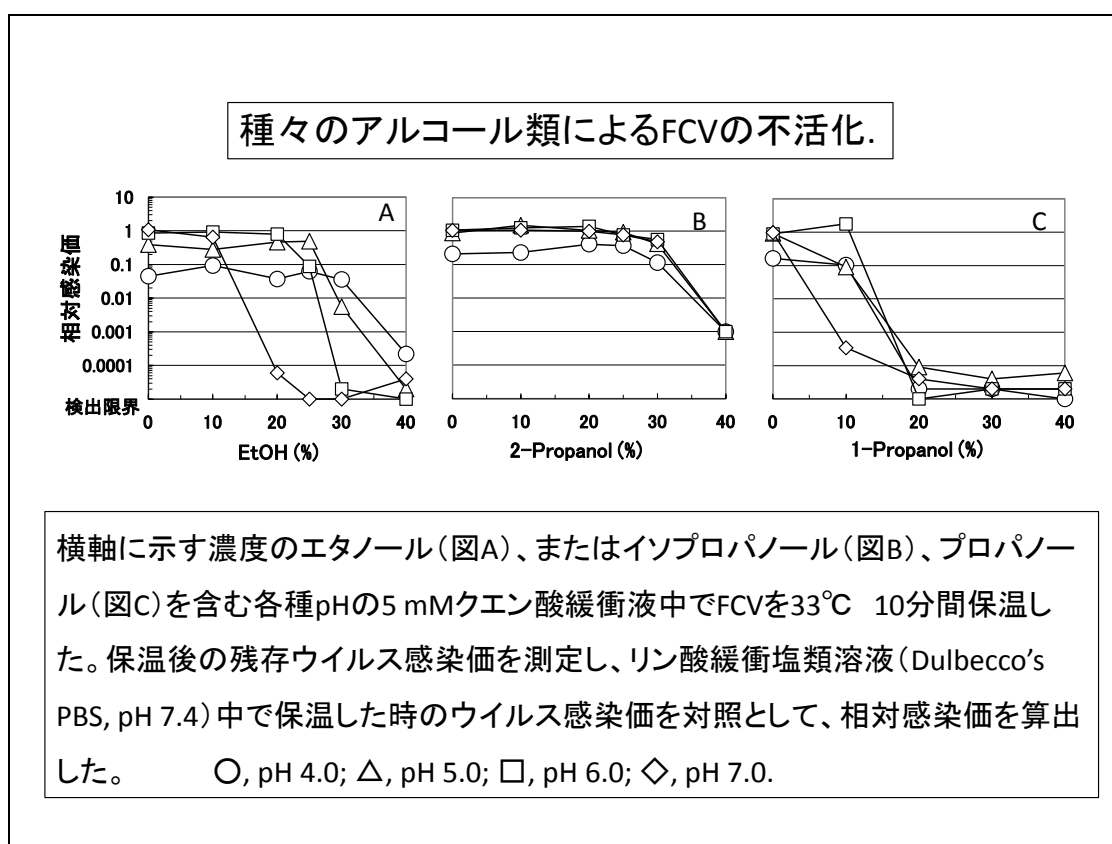
テーマ 3 はノロウイルス（消化器感染症の原因）やライノウイルス（呼吸器感染症の原因）の不活化を目指して、梅酢ポリフェノールとの協働作用により非エンベロープウイルスを不活化できる化合物の探索である。一般に、これら非エンベロープウイルスは消毒薬に対する抵抗性が強く、不活化のため消毒薬としては、組織障害が顕著な塩素系消毒薬が使われてきた。

ノロウイルスは培養細胞では増えず、ライノウイルスもブラック形成ができないので、代替ウイルスとしてこれらウイルスと類似の粒子構造を持つポリオウイルス、ネコカリシウイルス、コクサッキー B ウイルスを用いて解析を進めてきた。梅酢ポリフェノールとの協働作用を調べる候補化合物としては、タンパク質への不活化作用が知られている有機溶媒や界面活性剤を考え、これらのウイルスに対する単独作用やポリフェノールとの協働作用などを定量的かつ網羅的に解析することを目指した。しかし、残念ながら、非エンベロープウイルスは消毒薬に対しては強く、梅酢ポリフェノールとの協働作用によりこれらウイルスを不活化できる化合物や条件を見つけることはできなかった。しかし、この過程でアルコール類のウイルス不活化作用についても系統的かつ網羅的な解析を行い、以下を明らかにした。アルコールとしては、医療現場で用いられている 3 種のアルコール（エチルアルコール [EtOH]、イソプロピルアルコール [2-Propanol]、ノルマルプロピルアルコール [1-Propanol]、）を用いた。

- 1) EtOH による FCV の不活化は pH 依存性で、中性で強く酸性で弱い。
- 2) FCV 不活化の pH 依存性は 2-propanol でも見られるが、不活化作用は弱い。
- 3) 同様の pH 依存性は 1-Propanol でも見られ、顕著な不活化作用が見られる。
- 4) 同様の pH 依存性は PV-1 への EtOH 作用でも見られたが、不活化作用は弱い。

- 5) PV1 に対して 2-propanol には不活化作用がない。
- 6) 1-Propanol は PV-1 に対して顕著な不活化作用と pH 依存性を示す。
- 7) CB5 は最も EtOH 感受性が高く、pH 依存性である。
- 8) FCV 不活化と PV 不活化に対する温度の影響をみると弱い温度依存性がある。
- 9) 酸性 pH 条件下で調べると、EtOH 作用は NaCl 添加で強く増強される。
- 10) 0.5M NaCl 存在下での pH 依存性は逆転し、酸性側で強くなる。

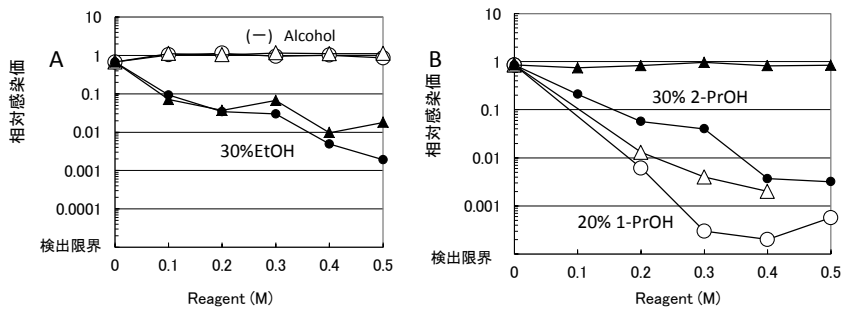
一例として、これらアルコールの FCV に対する作用を pH を変えて (pH 4、pH 5、pH 6 および pH 7) 調べて結果を以下の図に示したが、この結果に基づいて上記の 1～3 の結論が導き出された。スペースの関係で、他の結論の根拠となった実験データを省略するが、これらアルコール作用についての定量的で系統的な結果は、アルコールを基本とする消毒薬を開発する上に根本的な重要な知見と考えられたので、その一部は日本環境感染学会および日本防菌防黴学会で発表も行った。



これらの知見をもとに、梅酢ポリフェノールとアルコール類とを種々の溶媒条件下で組合わせて協働的な不活化の見られる条件を探索したが、見出すことは出来なかった。

同様に、タンパク質変性剤である尿素やグアニジン塩酸塩、または界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウムや塩化ベンザルコニウムを限られた条件下ではあるが、梅酢ポリフェノールと組み合わせて協働的なウイルス不活化が見られる条件を探索したが、見出すことは出来なかった。以下に、タンパク質変性剤とアルコールを組み合わせた時の協働作用を調べた結果を一例として示す。この結果も日本ウイルス学会で報告した。尿素もグアニジン塩酸塩も単独では 0.5M 以下の濃度で PV-1 不活化作用を持たないが、アルコール類が共存すると濃度依存的に不活化作用を示している。データには示していないが、この条件下でウメ酢ポリフェノールを加えると、不活化作用は逆に抑制された。

尿素又はグアニジン共存下でのPV-1不活化.



10 mMクエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中に、尿素 (○, ●) または塩酸グアニジン (△, ▲) と種々のアルコールを含む溶媒中でのPV-1を保温した。

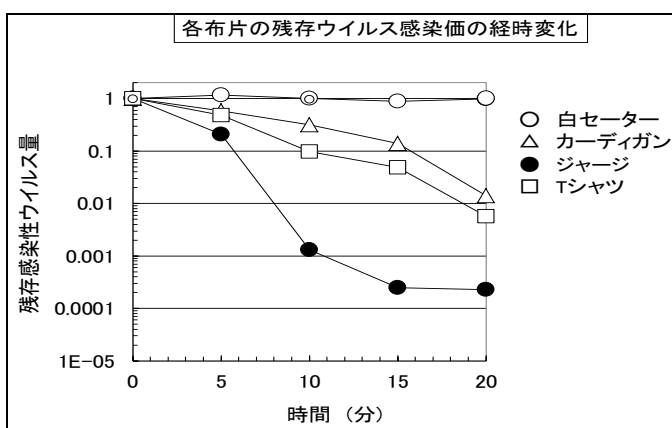
図Aはアルコールなし又は30%エタノール含有で37°C30分間の保温； 図Bは20%プロパノール含有又は30%イソプロパノール含有で37°C10分間の保温。

pH 6.0では0.5M以下の濃度で尿素もGdnも単独ではPV-1不活化作用を持たない (A) が、アルコール類存在下では濃度依存的に不活化作用を増強した (AとB)。

(4) 手指や生活環境を汚染したウイルスの伝播能についての定量的解析

テーマ 4 は手指や生活環境を汚染したウイルスがもつ“周囲のヒトへの伝播能”を定量的に解析し、ウイルスのもつ伝播能を梅酢ポリフェノールや農作物抽出液などで不活化する条件を調べるための基礎データを集積するものである。

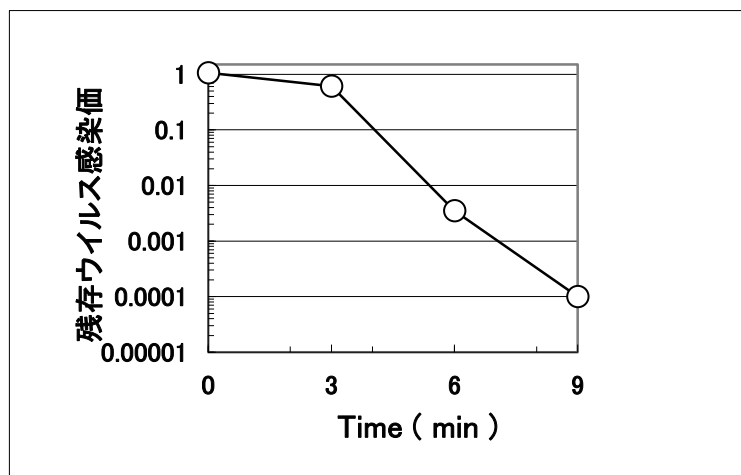
下の図に、4種の衣類（白セーター、カーディガン、ジャージ、Tシャツ）から取った布片をインフルエンザウイルスで汚染した時に、感染性ウイルスがどれくらいの時間、伝染力を持ったまま布片上に存在するのかを調べた結果を示した。



衣類の種類により汚染ウイルスの伝播可能な時間は異なり、この時間と衣類の素材や色、保水力などの関係を調べることができる。

さらに、下の図に手指を汚染したインフルエンザウイルスの感染価の消長を調べた結果を示した。微生物が付着した手指は、人から人に伝播する可能性が高く、接触感染の最

大の原因である。手掌上の 1 cm 円大のマーキング部位にインフルエンザウイルスを塗布し、指定時間後に 0.1% BSA-PBS を入れた試験管を汚染部位にあてて汚染ウイルスを試験管に洗い流し、回収された感染性ウイルス量を定量した。



回収される感染性ウイルス量は、3 分後から対数的に減少してゆく。この減少は手指を汚染したウイルス液の乾燥のタイミングと関係する可能性を考えているが、現段階では不明である。ウイルス種が変わると、感染価消長のカイネティクスにも変化が見られ、単純に乾燥によって失活するのかどうかは今後の課題となっている。

4 その他 (まとめ)

平成 18 年度大学等地域貢献促進事業助成において我々は、「和歌山県特産農作物及び加工食品の含有する抗ウイルス活性ならびにアポトーシス誘導活性の解析」という課題で助成を受け、実験方法の開発を含め研究を実施した。この研究において、本当に驚かされたことは、普通に食用に供されている和歌山県産の農作物の多くの物からポリオウイルス、インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルスなどの細胞内増殖を抑えたり、ウイルス粒子の感染性を不活化したりすることのできる活性が検出された。その数はランダムに解析した約 20 の農産物の中から 10 種あり、いわば身近にある食用農作物の 50% がこのようなウイルス感染を抑制する活性を持つ。もちろん、これらの活性は *in vitro* の試験管レベルでの活性であり、これらが直ちに「これら農作物が感染防御作用をもつ」といった結論に結び付く訳ではないが、これらの成分を同定すれば医薬品の開発につながる可能性もあると思われる。また、我々が抗ウイルス活性の試験に用いた材料は、県産品の宣伝を考えて、農産物を破碎したものから水分を直接に抽出した抽出液であり、基本的に「生で食べる」状態に対応したものであると考えて良い。したがって、生で食べるなら和歌山県産農産物の少なからぬものでその細胞液中にウイルス増殖を抑えたりウイルス感染性を失くしたりするものが含まれているとアピールでき、県農産物の付加価値につながられないかと考えている。

何故、身近な農作物からこれほど抗ウイルス活性が見つかるのかという問いから、我々は、「薬草や毒草として知られているものに限らず、多くの植物にとって微生物感染による変性や動物による食害を防ぐことがその生存に重要な意味を持ち、生存競争(進化)の過程で、感染や食害に対する抵抗のために自分の組織中に微生物や動物に対して生理的活性成分を含む方向に進化している」ことに気付かされた。このような見地に立てば、身

近な食用農作物が抗ウイルス活性を持つことは、そう驚くべきことではないということになる。今後、このような視点に立脚して、試料の範囲を広げ抗ウイルス活性物質の探索を考えてゆきたい。

これまで我々は、組織障害作用の少ない病原体不活化薬（消毒薬）を求めて、食品や食品由来成分のもつ抗ウイルスおよび殺ウイルス活性に注目して探索をつづけてきたが、本研究課題「和歌山県産農作物に由来する物質のもつ抗ウイルス活性の探索およびウイルス感染制御への応用に向けた基礎的研究」においては、以下の4点を明らかにすることを目的とした。

- ① 県産農作物中に見出されたこれらの活性について実験を補い、科学的な報告に耐えるだけの質と量をともなった解析を行う。
- ② 梅酢ポリフェノールについては作用機構を明らかにする。
- ③ ノロウイルス対策を念頭に、梅酢ポリフェノールと協働的に非エンベロープウイルスを不活化（殺ウイルス作用）する物質・条件を探索する。
- ④ 組織障害作用の小さい消毒薬の実用化に向けた基礎データとして、手指や生活環境を汚染したウイルスがもつ“周囲のヒトへの伝播能”を定量的に解析する。

A. トウガラシ類の抗ウイルス活性

県農産物に見出された抗ウイルス活性の確認と試料種類数の拡大（テーマ①）については、新たに県産農作物の種類を増やして、その抗ウイルス活性について定量的な解析を行った。その結果、幾つか新しい作物種にも活性を見出すことはできたが、同時に、これら農作物の生育環境についての情報が不足していることに気付き、解析を中断した。生産者氏名から和歌山県産ということは分かるが、生育環境、ことに農薬使用の有無が不明なままでは、抗ウイルス活性が見出されても残留農薬の影響の可能性を排除できず、論文として学界に報告するのは難しいと思われた。そこで、農薬使用のないことが明らかで外部からの化学的汚染の考える必要のない環境で育てられた農作物を求め、幸い、和歌山県農業試験場から農薬処理なしに生育されている「とうがらし」類を、それも複数の品種で複数の個体の分与を受けることができた。とうがらしは平成18年度の解析においても強い抗ウイルス活性が見出されており、また、トウガラシのひとつ、シシトウの生産高は和歌山県は全国3位と、県内での栽培量も多い。

結果の一部はまとめて、上記の「結果」の部で表に示したが、解析したトウガラシ類の全ての試料に低い濃度でもウイルス増殖抑制作用が見られ、抗HSV-1活性、抗インフルエンザウイルス活性、抗PV-1活性のあることが分かった。また、食用ではない葉の部分に強い活性があることも分かった。直接的なウイルス不活化活性（消毒作用）についてもHSV-1やインフルエンザに対する不活化作用は見出されたが、PV-1に対しては見出されず、あらためて非エンベロープウイルスの強さが確認された。これらの結果は、同一品種内でも複数の個体から採取されたものを解析した平均値で示しており、①トウガラシ類に普遍的にこの活性が存在すること、②品種間で活性に差があること、も明らかとなった。

B. ウメ酢ポリフェノール

今回の研究助成では、4つのテーマについての解析を提案した。しかし、「大学等地

域貢献促進事業助成」の趣旨を考えると、これら4点が均等の重要性をもつという訳ではなく、一番重要なのは②のテーマ「梅酢ポリフェノール」についての解析である。梅酢ポリフェノールは和歌山県の特産物であるウメに含まれるポリフェノール類であるが、ウメを材料として梅干を製造する際に生じる梅酢中に大量に含まれているポリフェノールを精製したものである。その工業的な製法も既に確立されており、また、安全性も確立され、種々の生理活性も明らかとなっている。我々も、梅酢ポリフェノールに抗ウイルス活性と顕著なウイルス不活化活性（殺ウイルス活性）を報告してきた。

今回の解析においては、申請時には取り上げていなかったのが本報告では結果を省いているが、最初に梅酢ポリフェノールの殺ウイルス活性に影響を与える要因のあることを明らかにし、それを取り除くためのひとつの工夫としてアルギニンを用いて梅酢ポリフェノールの水に対する溶解度を上げることが可能であることを示した。事実、アルギニンを用いて調製した梅酢ポリフェノールでは、その殺ウイルス活性が約10倍上昇しており、十分に溶解していると思われた梅酢ポリフェノール水溶液においてですらアルギニンは効果があった。アルギニンはタンパク質を構成するアミノ酸のひとつであり、我々は、先行研究において、①アルギニンがクマリンやアサイクログアノシンといった水に難溶性を示す化合物の溶解度を上げること、また、②単独でも微酸性アルギニンがエンベロープウイルスに対する不活化作用を示すことを明らかにしている。しかし、「結果」の部で図に示したが、再構成実験の結果からはアルギニンには梅酢ポリフェノールとの協働作用の効果はなく、単によりよく梅酢ポリフェノールを溶かしているものと推定された。

アルギニンの可溶化作用の機構については、まだ、解析していない。しかし、アルギニン分子のもつグアニジン側鎖には独特の性質があり、その結果、アミノ酸として親水性であるアルギニン分子は、同時にタンパク質の疎水性部分と疎水性相互作用を持つことができ、通常はタンパク質分子内に埋もれている疎水性部分がわずかでもタンパク質分子表面にも露出されると、そこに結合しウイルス不活化などを起こすことが考えられている。したがって、梅酢ポリフェノール分子に対しても、フェノール環による疎水性を介した会合が形成されて水への溶解度が低下した状態に陥った場合（梅酢ポリフェノール水溶液中に微小沈殿が生じ、溶液中の活性梅酢ポリフェノール分子数が減少する）に、もしアルギニンが存在すると梅酢ポリフェノール分子のフェノール環相互の疎水性相互作用にアルギニン分子が干渉し、結果として、活性のあるポリフェノール分子の数を担保できたと考えられる。

ウイルスの不活化の機構について考察すると、ポリフェノール分子がタンパク質に結合でき、酵素を不活化することもあることは知られているので、梅酢ポリフェノールの場合もウイルス粒子タンパク質に結合することによって、そのタンパク質の機能に悪影響を与えた結果、ウイルスの感染性が損なわれたものと考えられる。ちなみに、アルギニンの場合は分子内のグアニジウム残基の存在が重要で、水溶液中で動的構造をとっているタンパク質が3次元構造に揺らぎを生じた時にグアニジウム基を介してタンパク質の揺らぎで生じた分子内・分子間のすきまに入りこみ、タンパク質の高次構造を穏やかに壊して行くものと考えている。

梅酢ポリフェノールの抗ウイルス作用については既に明らかとしていたので、本研究ではその機構について解析した。

最初に、これまで解析していなかった細胞表面レセプターへの結合（ウイルス吸着過程）に与える影響を調べた。感受性細胞の細胞表面膜上にはウイルスレセプターがあ

り、レセプターへのウイルス粒子の結合が細胞レベルにおけるウイルス感染の開始反応となる。「結果」の部に示した図も含め、HSV-1、インフルエンザウイルス、PV-1 の3種のウイルスについて調べた。その結果、梅酢ポリフェノールは PV-1 の吸着過程については阻害を示さなかったが、他の二つのウイルスについては阻害を示した。ことに、HSV-1 の吸着過程については強い阻害を示し、0.1 mg/ml という低濃度でも阻害が見られた（データ省略）。これまでの抗ウイルス活性のアッセイにおいては吸着過程後のウイルス増殖過程の阻害を見ているので、梅酢ポリフェノールは HSV-1 とインフルエンザウイルスに対しては少なくとも増殖過程の中の2ヶ所以上に阻害の標的を持つことが明らかとなった。

ウイルス吸着阻害は梅酢ポリフェノールがウイルスや細胞と共存する1時間の吸着操作過程の中の反応である。そこで、梅酢ポリフェノールがウイルスのスパイクタンパク質に作用したのか、細胞表面レセプターに作用したのかを調べるために、細胞への梅酢ポリフェノールの前処理を行った。「結果」の部に鋭敏な吸着阻害が見られた HSV-1 の場合の図を示したが、Vero 細胞への1時間の前処理では吸着阻害の効果は見られず、効果的な吸着阻害のためにはウイルスの存在下で梅酢ポリフェノール処理を行う必要があることが明らかとなった。この結果から、我々は梅酢ポリフェノールが HSV-1 やインフルエンザウイルス粒子と結合し、吸着阻害を起こしたと考えている。

細胞内ウイルス増殖に対するウメ酢ポリフェノールの作用を調べるために、常法にしたがって、梅酢ポリフェノール存在下での一段増殖曲線を調べた。すでに「結果」の部で述べたので省略するが、感染初期過程の増殖曲線に見られた子孫ウイルス形成の遅延は感染初期過程（ウイルスゲノム DNA 複製の完了以前の過程）での阻害を示唆し、感染後期の増殖曲線からは感染後期過程（ウイルスゲノム DNA 複製の完了した後のウイルス粒子組立て過程）の進行には異常のないことが明らかであり、後者は感染6時間後の梅酢ポリフェノールの添加で増殖曲線の影響がないことから確かめられた。これらの結果は梅酢ポリフェノールによる HSV-1 増殖の阻害が、ウイルス増殖の特異的な増殖ステップに対する阻害（感染初期過程のどれかのステップ）であり、細胞毒性による細胞機能の低下に伴った非特異的な障害ではないことを示唆する。HSV-1 ほど明解ではないが同様の結果はインフルエンザウイルスでも見られた。

梅酢ポリフェノールが動物に対して安全であることは既に三谷らによって明らかにされているが、細胞レベルでのウイルス増殖の立場から梅酢ポリフェノールの細胞毒性についても確認した。色素トリパンブルーを用いた色素排除法によって解析したが、少なくとも抗ウイルス作用の見られる濃度範囲で梅酢ポリフェノールはウイルス増殖が完了し終わる時間まで、細胞機能に障害を与えなかった。

C. 非エンベロープウイルス不活化に対し梅酢ポリフェノールと協働作用する化合物の探索（テーマ③）。

生体にとって穏和な条件下でウイルスを不活化することが知られている種々の化合物（アルコール類、タンパク質変性剤[尿素とグアニジン；尿素は化粧品にも使われている]、界面活性剤類）を梅酢ポリフェノールと組み合わせることで非エンベロープウイルスの不活化ができないかを非常に手間をかけて検討した。このためには、まず、これら化合物自体のウイルス不活化特性をすることが基本と考え、これら化合物を作用する溶媒条件（化合物濃度、pH、溶媒のイオン種、イオン強度、温度、時間）を検討した。しかし、一部の化合物との組み合わせでは梅酢ポリフェノールがウイルス不活化で

はなくウイルスの保護に働く場合があるなど、個別的には興味のある現象を見出し、また、種々の不活化薬について基礎的に重要なデータ（その一つとしてアルコールの例を「結果」の部には示した）が得られたが、所期の目的であるノロウイルスの不活化につながるような協働作用を持つ化合物は未だ見つかっていない。

D. 手指や生活環境を汚染したウイルスがもつ“伝播能”の定量的解析。

組織障害作用の小さい消毒薬の実用化に向けては、どういう場面での使用が考えられるか応用の重要なポイントとなる。本研究においては、まず最初のステップとして衣服や生活環境、手指など、身近な外部環境での汚染ウイルスの感染性の消長をしらべた。手指などについては、和歌山県立医科大学倫理委員会の承認を得ての実験である。

実験を始めて分かったことのひとつは、実際の環境を想定しての実験は試験管の実験に較べると実験ごとの変化が大きく、定量的な再現性を得ることの困難さであった。そのため、必然的に試料の数を大きくし、実験回数を多くして誤差の範囲を実測することが必要であった。

汚染ウイルスの伝播能は、汚染部位をウイルス希釈液で洗浄した時に回収できる感染性ウイルス量として定義した。また、実際のウイルス汚染においては、汚染ウイルス量は非常に大きな幅があり、また、汚染ウイルス液の組成も鼻汁、唾液、血液、糞尿など、想定される汚染源によって大きく変わるため、モデル汚染ウイルス液としては0.1% BSAを含んだものと5% BSAを含んだものを用意して、実験を行っている。前述の通り、手間と時間をかけてデータを集積しているため今回の結果としては、衣服または手指を汚染したウイルスから回収できるウイルス感染価の消長を調べたものを「結果」の部に記した。定量的な解析法とその問題点・解決策がほぼ確立できたので、今後は解析のばねを広げ、今後梅酢ポリフェノールなど消毒活性をもつものの商品化を考える際に必要な基盤情報を整えて行きたい。

パスツールは「基礎科学と応用科学というような区別はなく、科学とその応用がある」と指摘している。和歌山県産農作物といった極めて身近な素材の中から研究材料を取り、しかも感染対策という現代社会に喫緊の課題に取り組みながら、タンパク質構造の安定化機構という生命維持の基本を考えて実験できるということは、研究者としては本当に幸せなことだと日々感じさせて頂いている。今日もみんな、元気に研究に励んでいる。

注) 用紙はA 4 版縦長横書きとし、2 0 頁から2 5 頁程度 (約3 5, 0 0 0 字程度) と
すること。(写真、図表の挿入可)

(県補助金等交付規則第 13 条関係)