

ウイルス感染症に対する食用大型海藻アカモク (*Sargassum horneri*) の有用性

河原敏男, 林 京子, 李 貞範*, 渡辺卓巳**

Function of an edible algae, *Sargassum horneri*, in viral infections

Toshio Kawahara, Kyoko Hayashi, Lee Bung-Jung* and Takumi Watanabe**

Sargassum horneri (Akamoku) is a brown algae and is distributed over the shallow sea of Japan, except east of Hokkaido. In the present study, we analyzed the arsenic contained in the algae, evaluated therapeutic effects of Akamoku powder against influenza A virus infection using mouse model, and virucidal activities of the extract of the algae. The inner states of Arsenic was evaluated by XAFS using a synchrotron radiation. The oral administration of Akamoku powder in influenza virus-infected mice suppressed viral proliferation in the lung, and had stimulatory effects on neutralizing antibody production. The ethanol extract of Akamoku showed potent virucidal activities against herpes simplex virus type 2, influenza A virus and feline calicivirus. In summary, Akamoku is a potential candidate for the treatment of viral infections.

Keywords : *Influenza virus, Herpes simplex virus, Feline calicivirus, Mouse infection model, Virucidal activity*

1. はじめに

自然界に存在するウイルスには、細菌ウイルス、植物ウイルス及び動物ウイルスがある。動物ウイルスの一部は、ヒトに感染して人体に障害（ウイルス感染症）をもたらす、これらを病原性ウイルスと称する。人類は、ウイルス感染症を抑制する闘いを今も続けており、最近でも世界的に新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）感染対策に多大な労力を費やしている。皮肉なことに、医療の高度化は高齢者や生活習慣病患者、臓器移植者などの免疫機能（感染防御力）低下状態の人々を増やしてきた。このような社会的背景から、今後もウイルス感染症に対抗する手段の模索は続いていくと予想される。

我々は以前から、ワクチンも治療薬もウイルス感染症対策としては十分ではない点に注目して、主として食用藻類の機能解明を通して第三の対策として生体が本来有する感染防御力の維持・増強を目指してきた。その過程で、藻類に含有される硫酸化多糖体が活性成分の一種であること¹⁻⁵⁾、さらに生体における感染防御能の増強を介してウイルス感染症抑制をもたらすこと⁶⁻⁹⁾を明らかにしてきた。

* 富山大学 ** 大学院生

本研究では、食用藻類の一種であるアカモク (*Sargassum horneri*) (図-1) を材料として用いた。アカモクは、北海道の東海岸を除く日本全国の浅瀬に自生するホンダワラ科の大型海藻であり、資源量は豊富であるにもかかわらず十分に利用されているとは言い難い。これまでに抗ウイルス活性の報告がなされている^{10,11)}。

ここでもう一度ウイルス感染症対策を振り返ってみれば、ワクチンは免疫機能低下者にとって抗体の産生、すなわち免疫機能に依拠した生体反応を起こすことは荷が重すぎるし、またウイルスが抗原変異する毎に作り替える必要がある。治療薬(抗ウイルス薬)は、反復して長期使用されれば薬剤耐性ウイルスの出現、それに伴う薬効の著減への道をたどることになる。



図-1 アカモク (*Sargassum horneri*)

そこで我々は、これらの対策上の問題を克服するためには、ウイルスの抗原変異にも対応で

きる生体側の免疫機能の増強と、耐性ウイルス出現に結び付くことのない殺ウイルス活性(ウイルス不活化作用)とをアカモクに求めて、その機能を評価した。具体的には、① アカモクの長期利用を想定した場合に“有害物質”とみなされるヒ素の含有状態を分析すること、② 実験動物モデルを用いたウイルス感染症におけるアカモクの有用性を産地別に評価すること、③ アカモク抽出物の殺ウイルス活性を評価することを研究課題とした。また、免疫刺激効果は、日本が直面している高齢化社会での健康長寿への寄与が期待されるが、ヒ素等の成分の解析がアカモクの一層の活用拡大にとって必須である。そこで、常滑産のアカモクを中心に、日本各地のアカモクを比較する。

2. 材料および方法

2.1. ヒ素の分析

試料として、愛知県常滑産に加えて、日本各地(愛媛、熊本、大分、徳島、岩手県)産からの各種乾燥粉末を準備した。また、海藻を乾燥したもの、及び、乾燥させずに冷凍保存してあった試料(生試料)を使った。ヒ素の調査としてあいちシンクロトロン光センターのビームライン(BL5S1)で、XAFS(透過法・蛍光収量法)、蛍光 X 線分析を行った。

2.2. 動物感染実験

日本各地(常滑市、愛媛県、熊本県、大分県、徳島県、岩手県)から収集した成熟期のアカモクの乾燥粉末(1日当たり 5 mg)を、5週齢の BALB/c マウスに、A 型インフルエンザウイルス(A/NWS/33, H1N1 亜型)感染の1週間前から2週間後まで、1日2回、経口投与した。陽性対照として抗インフルエンザ薬タミフル(リン酸オセルタミビル)を1日 0.2 mg 投与した。ウイルス(2×10^4 PFU/50 μ L/mouse)を、麻酔下で経鼻接種した。マウスの体重を感染後14日間測定した。感染3日後に各群の半数の動物($n = 5$)の肺のウイルス量を測定した。感染14日後に、残り半数のマウスの血清及び気道洗浄液(BALF)の中和抗体価を測定した。中和抗体価は、ウイルス(100 PFU)の感染力を1時間で50%低下させる血清・BALFの希釈倍数として求めた。有意差検定には、Student の t 検定を用いた。

2.3. 殺ウイルス活性試験

アカモク 10 g 当たり 30%エタノールを加えて2時間抽出し, 30 mL まで濃縮した(固形分 2.5%). このエキス単独, 33%エタノール単独, 及びエキスと 33%エタノールの併用の各サンプルを活性試験に供した. 殺ウイルス活性は, サンプルとウイルス (1×10^6 PFU/mL) とを 1 : 1 で混合し, 10 分後および1時間室温で処理後に感染性を有するウイルス量をプラークアッセイによって測定した. ウイルスとしては, 単純ヘルペスウイルス 2 型 (UW264 株) (HSV-2), A 型インフルエンザウイルス (A/NWS/33) (IFV), ネコカリシウイルス (F4 株) (FCV) を用い, それぞれの宿主細胞として Vero (アフリカミドリザル腎臓由来) 細胞, MDCK (ネコ腎臓由来) 細胞, 及び CRFK (ネコ腎臓由来) 細胞を培養した.



タブレット試料



藻体(葉)

図-2 試料の形状の例

3. 結果

3.1. 量子ビームによるヒ素の解析

試料は, 乾燥粉末をプレス成型した試料 (タブレット試料), 及び, 藻体の部位を各種切り出してろ紙に張り付けたものを用いた(図-2). 藻体からの蛍光は少し小さかったものの, どの試料からもヒ素のスペクトルが得られた. その一例として, タブレット試料で成熟前と成熟期を比較を図-3 に示す. 無機ヒ素のスペクトルを参考に考えると, 成熟期ではヒ素のピークが低エネルギー側にシフトし, これは価数が小さいほうに変化していると考えられる. 次に, 部位の違いによるスペクトル変化として, 成熟前の茎と葉の比較のスペクトルを図-4 に示す. 成熟前の XAFS ピークで茎の部分は左へシフト(低価数側)していることが分かった.

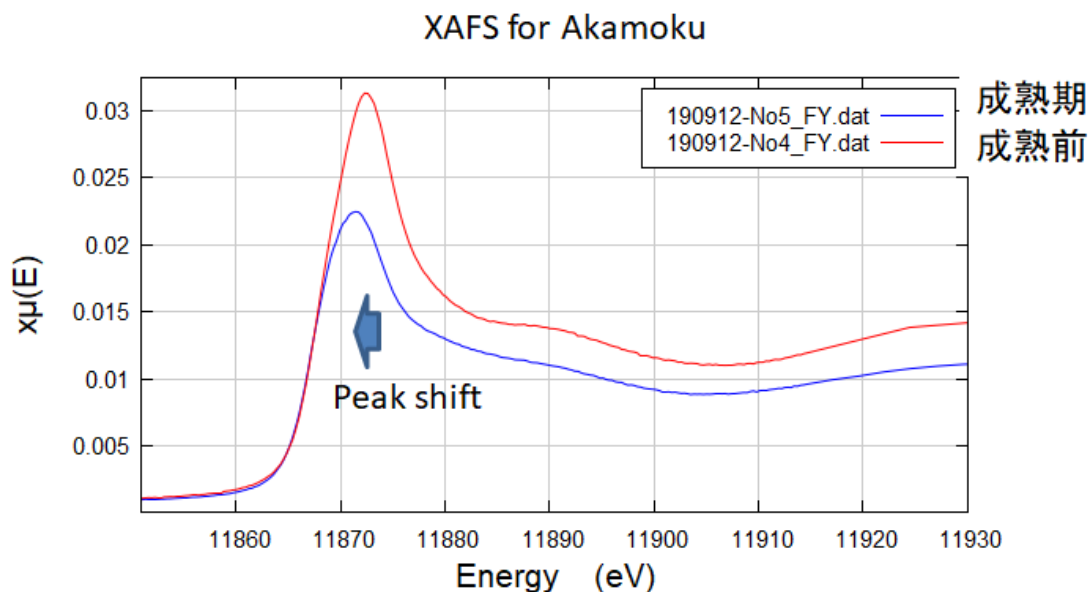


図-3 成熟前と成熟期の XAFS の比較

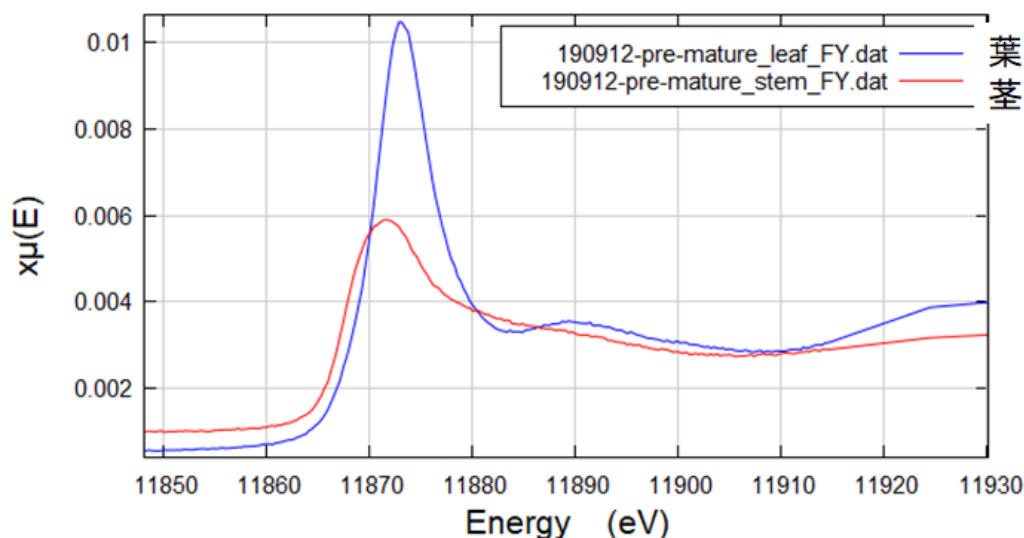


図-4 成熟前の茎と葉の XAFS の比較

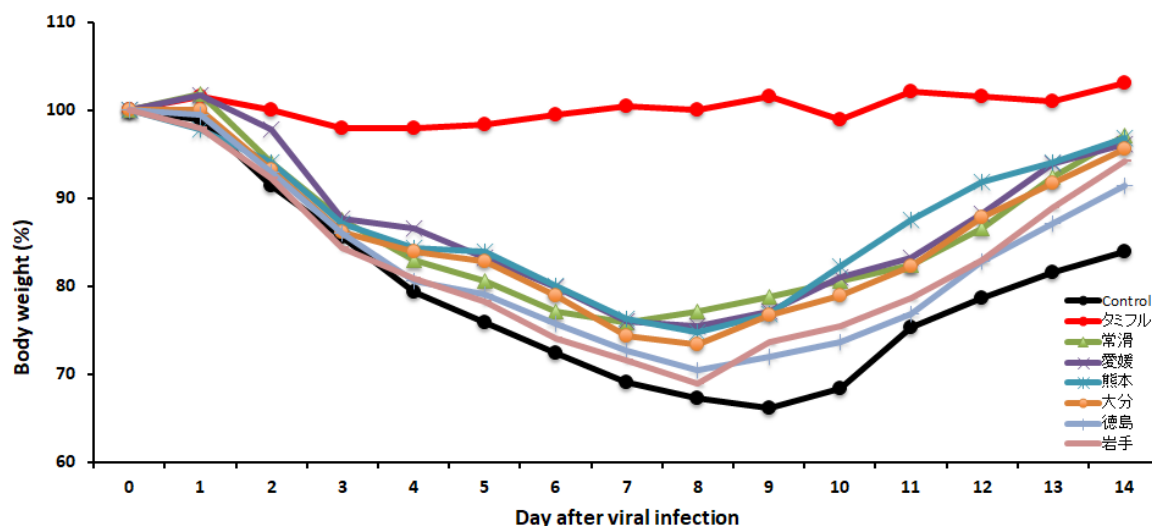


図-5 ウイルス感染後の体重の変化

3.2. アカモク粉末のインフルエンザ治療効果

産地別アカモク粉末をインフルエンザウイルス感染マウスに投与した時の経時的体重変化を図-5 に示す。対照群（水投与群）では、感染後約1週間にわたって体重が漸減し、2週間後にも元の体重の80%程度にしか回復しなかった。タミフル投与群では、2週間の観察期間中、体重増減はほとんどみられなかった。一方、アカモク粉末を投与した場合、感染1週間後から体重の回復が認められ、2週間後には約90%にまで回復し、対照群に比べて常に体重減少が抑制された。

ウイルスの経鼻接種後、肺のウイルス量は3~4日目まで最大となり、1週間後には体内のウイルスは検出されなくなる。感染3日後のウイルス量を測定したところ、対照群に比べて各産地のアカモク粉末投与群では有意に ($p < 0.05$) に減少した (図-6)。

ウイルス感染に伴って産生される局所 (BALF) 及び全身 (血清) の中和抗体価を測定した。BALF中の抗体価は、対照群に比べて上昇し (図-7)、同様に血清でも上昇が認められた (図-8)。

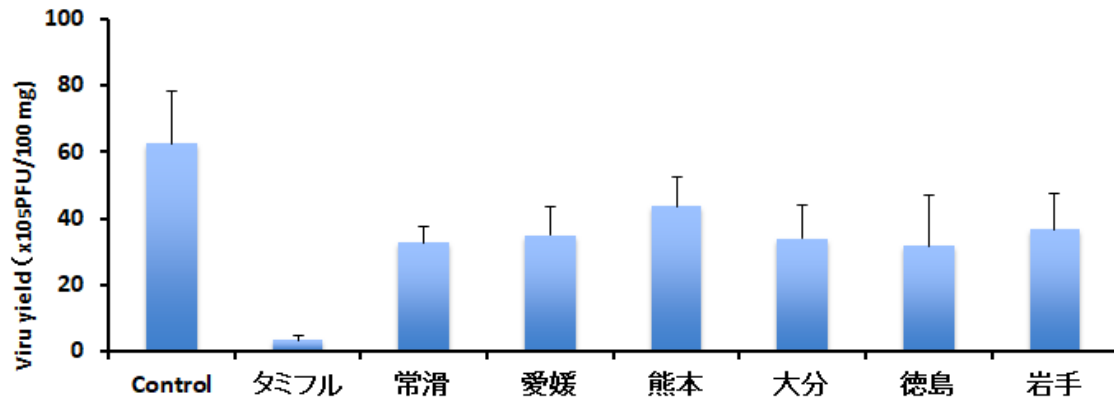


図-6 ウイルス感染 3 日後の肺のウイルス量

有意差 (Control に対して) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

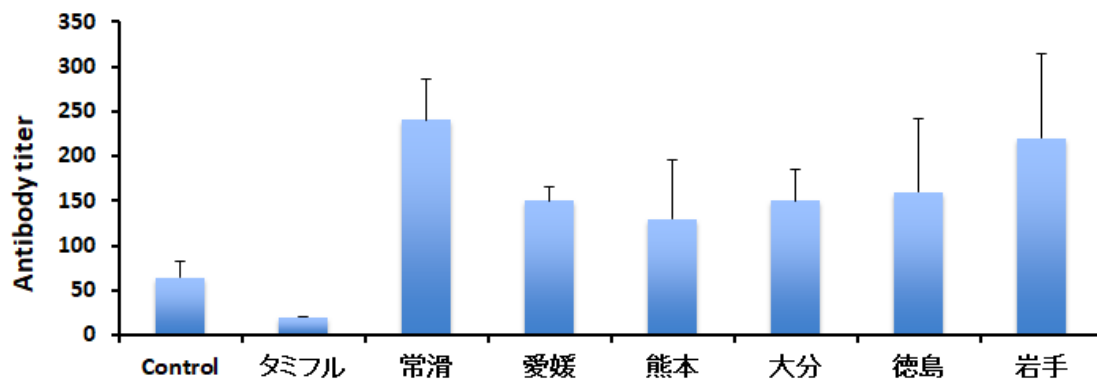


図-7 ウイルス感染 1 4 日後の気道洗浄液の中和抗体価

有意差 (Control に対して) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

産地の違いによるアカモク粉末の効果には顕著な差異がみられなかった。

3.3. アカモクエキスの殺ウイルス効果

対照区 (リン酸緩衝生理食塩水, PBS) の 10 分間処理後のウイルス量を 100% とした時の残存ウイルス量を % で求めた (表-1). HSV-2, IFV または FCV を 10 分間処理した時のウイルス残存量は, アカモクエキス単独区ではそれぞれ 0.1%, 16%, 97% となり, 30% エタノール単独区では 0%, 0.12%, 0.04% となり, 一方, アカモクエキスとエタノールを併用するといずれのウイルスも検出限界以下にまで減少した。

60 分間の処理時には, 殺ウイルス効果が高められたが, アカモクエキスとエタノールとの併用区でのみ, 3 種類のウイルスが検出限界以下となった。

4. 考察

放射光での吸収ピークシフトの結果から, 常滑産アカモクでは還元作用があるのではないかと考えられた。これは, 加工プロセスで機能性が変化することを示している。今後, 藻体からの信号が小さかったので, 乾燥濃縮等を行って比較していきたい。また, 採取直後の海藻そのもののスペクトルも調べたいと考えている。

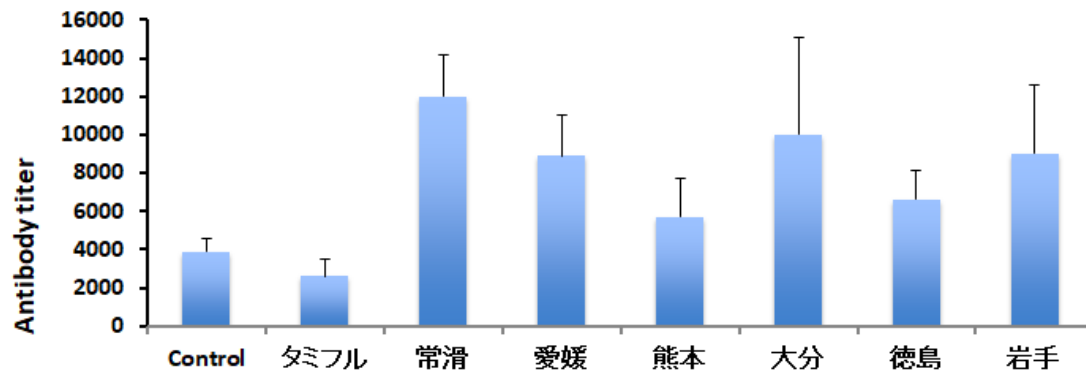


図-8 ウイルス感染 1 4 日後の血清の中和抗体価
有意差 (Control に対して) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

表-1 殺ウイルス活性

Sample	Time of treatment (min)	Remaining virus yield (%)		
		HSV-2	IFV	FCV
Control (PBS)	10	100	100	100
	60	82	86	84
Extract	10	0.1	16	97
	60	0	3.6	69
33% Ethanol	10	0	0.12	0.049
	60	0	0	0.016
Extract + 33% Ethanol	10	0	0	0
	60	0	0	0

0%: less than 1×10^2 PFU/mL

HSV-2: Herpes simplex virus type 2; IFV: Influenza A virus; FCV: Feline calicivirus

アカモク粉末は、インフルエンザウイルス感染症において、体内のウイルス増殖抑制効果を示した。インフルエンザウイルス感染時のマウスでは、体重減少が発症の程度を反映しており、アカモク粉末投与群では体重減少が抑制されたことから、インフルエンザ症状を緩和する効果がみられた。今回の実験では、感染 1 週間前から投与したことから、ウイルス感染時には自然免疫系の活性化 (NK 細胞やマクロファージの活性化など) が生じていたと推察されるが、この点はさらに詳細に検討する必要がある。また、ウイルス特異的抗体産生刺激効果が認められたが、この作用機序については、アカモクに多量含有されるフコイダン (硫酸化多糖体の一種) が腸管免疫系を刺激した結果であろうと推察される。この点に関連して、我々は最近、別種の藻類由来の硫酸化多糖体が、腸管免疫系の中心的役割を果たしているパイエル板の上層に存在する M 細胞から取り込まれることを証明した^{1,2)}。産地の異なるアカモクの効果を比較したが、大きな差異はみられなかったことから、広く分布するアカモクを、生育環境を問わずに利用できると考えられる。

本研究において、アカモクのエタノール抽出物に殺 HSV-2, IFV および FCV 作用がみられることを初めて証明した。今回の研究では、殺ウイルス活性が消毒剤 (ほとんどの市販品ではエタノールが 50~55% 含有されている) の中心的機能であることに着目して、アカモクエキスにエタノールを併用したところ、10 分間という比較的短時間の処理でもウイルスの感染力を著減させることが明らかになった。特に、FCV は、現時点ではワクチンも治療薬も開発されていないヒトノロウイルスの代替ウイルスであり、本ウイルスに対しても強力な不活化作用をもたらしたことは大きな成果と考えられる。現在、アカモクエキス中の殺ウイルス活性成分の分離・同定と、殺ノロウイルス活性の増強手段とを検討中である。

謝辞

本研究は中部大学先端研究センター 2020 年度プロジェクト 3 の援助を受け遂行されたものであり, ここに謝意を表します.

参考文献

- 1) K. Hayashi, T. Hayashi and I. Kojima: A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: In vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, Vol.12, 1463-1471(1996)
- 2) J-B. Lee, K. Hayashi, T. Hayashi, U. Sankawa and M. Maeda: Antiviral activities against HSV-1, HCMV, and HIV-1 of rhamnan sulfate from *Monostroma laissimum*, *Planta Med.*, Vol.65, 439-441(1999)
- 3) J-B. Lee, K. Hayashi, M. Hashimoto, T. Nakano and T. Hayashi: Novel antiviral fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* (Mekabu), *Chem. Pharm. Bull.*, Vol.52, 1091-1094(2004)
- 4) K. Kanekiyo, J-B. Lee, K. Hayashi, H. Takenaka, Y. Hayakawa, S. Endo and T. Hayashi: Isolation of an antiviral polysaccharide, nostoflan, from a terrestrial Cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme*, *J. Nat. Prod.*, Vol.68, 1037-1041(2005)
- 5) J-B. Lee, A. Takeshita, K. Hayashi and T. Hayashi: Structures and antiviral activities of polysaccharides from *Sargassum trichophyllum*, *Carbohydr. Polym.*, Vol. 86, 995-999(2011)
- 6) K. Hayashi, T. Nakano, M. Hashimoto, K. Kanekiyo and T. Hayashi: Defensive effects of a fucoidan from brown alga *Undaria pinnatifida* against herpes simplex virus infection, *Int. Immunopharmacol.*, Vol.8, 109-116(2008)
- 7) J-B. Lee, Y. Ohta, K. Hayashi and T. Hayashi: Immunostimulating effects of galactan sulfate from *Codium fragile*, *Carbohydr. Res.*, Vol.345, 1452-1454(2010)
- 8) J-B. Lee, S. Koizumi, K. Hayashi and T. Hayashi: Structure of rhamnan sulfate from the green alga *Monostroma nitidum* and its anti-herpetic effect, *Carbohydr. Polym.*, Vol.81, 572-577(2010)
- 9) K. Hayashi, J-B. Lee, T. Nakano and T. Hayashi: Anti-influenza A virus characteristics of a fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* in mice with normal and compromised immunity, *Microb. Infect.*, Vol.15, 302-309(2013)
- 10) T. Hoshino, T. Hayashi, K. Hayashi, J. Hamada and J-B. Lee: An antivirally active sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri* (TURNER) C. AGARDH, *Biol. Pharm. Bull.*, Vol.21, 730-734(1998)
- 11) P. Srisomporn, K. Hayashi, J-B. Lee, U. Sankawa and T. Hayashi: A novel antivirally active fucan sulfate from an edible brown alga, *Sargassum horneri*, *Chem. Pharm. Bull.*, Vol.49, 484-485(2001)
- 12) M. Terasawa, K. Hayashi, J-B. Lee, K. Nishimura, K. Matsuda, T. Hayashi and T. Kawahara: Anti-influenza A virus activity of rhamnan sulfate from green algae *Monostroma nitidum* in mice with normal and compromised immunity, *Marine Drugs* Vol.18, 254, 2020; doi:10.3390/md 18050254