

福島農総セ研報 11 : 31-43 (2020)

## ブルーベリー及びナツハゼ果実の インフルエンザウイルス感染阻害活性に関する研究\*

関澤 春仁\*\*

A study of the influenza virus infection inhibitory activity of blueberry  
and Natsuhaze (*Vaccinium Oldhamii*) fruits

Haruhito SEKIZAWA

### 概要

ブルーベリー及びその近縁の野生種（以下ブルーベリー類）はアントシアニン等のポリフェノールを多く含有しており、様々な機能性を示す果実として知られる。しかしながら抗ウイルス作用に関する報告は少ない。そこでブルーベリー類果実の抗インフルエンザウイルス作用を明らかにするため、培養細胞へのインフルエンザウイルス（以下 IFV）感染の初期段階の感染阻害活性について、ブルーベリー類果実の栽培種及び近縁の野生種を比較した。その結果、栽培種では北部ハイブッシュ系のエリオットとラビットアイ系に分類される品種群の感染阻害活性が高く、野生種ではナツハゼやビルベリーの感染阻害活性が非常に高いことを明らかとし、感染阻害活性と総ポリフェノール含量には高い相関があることを明らかにした。

これらの結果を踏まえ、IFV 感染阻害活性が高かったナツハゼについて、感染阻害活性に関与する成分の探索を行った。ナツハゼ果実抽出物を合成吸着樹脂と濃度の異なるエタノールを用いて分画したところ、エタノール濃度 10 および 20% の画分にはナツハゼに特徴的なポリフェノールであるアントシアニンが多く含まれていたが、IFV 感染阻害活性は低いことが明らかとなった。一方、エタノール濃度 30、40、50% の画分は高い IFV 感染阻害活性を示し、アントシアニン以外のポリフェノールが多く含まれていると推察された。そこで HPLC で分析した結果、30、40、50% 濃度の画分に IFV 感染阻害活性の高い特徴的な 3 つのピークを見出した。これら 3 つのピークを HPLC で分取し、ウイルス感染阻害活性を調べたところ、強い活性を示す画分を確認した。それぞれの画分を ESI-LC/MS で分析した結果、それらの画分にはプロシアニジン B2 とフェルラ酸誘導体、フェルラ酸六炭糖が含まれていることが明らかとなった。

また、複数の IFV 型及び株を用いてブルーベリー類果実の IFV 感染阻害活性を調べたところ、2009 年に流行した A 型と B 型の IFV に対しては活性が高く、タミフル耐性 A 型と A 香港型の IFV に対しては活性が低い結果が得られ、ブルーベリー類果実の IFV 感染阻害活性はウイルスの型や株の違いによって差があることが明らかとなった。

さらに、ナツハゼ果実の加工方法が IFV 感染阻害活性に及ぼす影響を調べた結果、加熱加工を行っても感染阻害活性は維持できることが確認され、ポリフェノールを多く含むような加工を行うことによって IFV 感染阻害活性が高まることが確認された。

これらの結果を踏まえ、ナツハゼ果実を用いた飴を試作して IFV 感染阻害活性を確認したところ、ナツハゼ果実乾燥粉末を 1% 添加した飴は 10 倍希釈しても IFV の感染を 80% 以上阻害していることが確認された。

本研究により、ナツハゼを含むブルーベリー類果実においては IFV 感染阻害活性を活かした加工品開発が期待できることが明らかとなった。

Keywords : blueberry, Natsuhaze(*Vaccinium Oldhamii*), influenza virus, food function

キーワード : ブルーベリー、ナツハゼ、インフルエンザウイルス、食品機能

受理日 平成 30 年 10 月 9 日

\*本論文は、福島県立医科大学学位論文を基に編集・加筆したものである。

\*\*現福島県農林水産部生産流通総室畜産課

## 目次

第1章 序論	32	第4章 異なるウイルス型・株が IFV 感染阻害活性に及ぼす影響	
第2章 ブルーベリー品種間の IFV 感染阻害活性の比較		4.1 方法	
2.1 方法		4.1.1 試料	38
2.1.1 試料	33	4.1.2 細胞とウイルス	38
2.1.2 細胞とウイルス	33	4.1.3 IFV 感染阻害活性の評価	38
2.1.3 IFV 感染阻害活性の評価	33	4.1.4 総ポリフェノール含量の測定	38
2.1.4 総ポリフェノール含量の測定	33	4.2 結果	
2.2 結果		4.2.1 IFV 感染阻害活性のウイルス型・株の比較	38
2.2.1 IFV 感染阻害活性の品種比較	33	4.2.2 総ポリフェノール含量と IFV 感染阻害活性の関係	38
2.2.2 総ポリフェノール含量と IFV 感染阻害活性の関係	34	第5章 ナツハゼ果実の加工方法と IFV 感染阻害活性	
第3章 ナツハゼ果実に含まれる IFV 感染阻害活性成分の探索		5.1 方法	
3.1 方法		5.1.1 試料	38
3.1.1 試料	34	5.1.2 細胞とウイルス	39
3.1.2 細胞とウイルス	35	5.1.3 IFV 感染阻害活性の評価	39
3.1.3 IFV 感染阻害活性の評価	35	5.1.4 総ポリフェノール含量の測定	39
3.1.4 総ポリフェノール含量の測定	35	5.1.5 総アントシアニン含量の測定	39
3.1.5 総アントシアニン含量の測定	35	5.2 結果	
3.1.6 ESI-LC/MS による IFV 感染阻害活性成分の分子量の測定	35	5.2.1 果汁素材の IFV 感染阻害活性と総ポリフェノールおよび総アントシアニン含量	39
3.2 結果		5.2.2 ナツハゼ餡の IFV 感染阻害活性と総ポリフェノール含量およびアントシアニン含量	40
3.2.1 ナツハゼ果実抽出物分離画分に含まれるポリフェノールと IFV 感染阻害活性の関係	35	第6章 考察	41
3.2.2 ESI-LC/MS による IFV 感染阻害活性成分の分子量の測定	37	謝辞	42
		引用文献	42

## 第1章 序論

ブルーベリー及びその近縁野生種（以下ブルーベリー類）は生食や加工に幅広く利用されている果実の一つで、世界で広く栽培されている。アントシアニン等のポリフェノールを多く含んでいることから、様々な機能が期待されており、サプリメント等の加工食品にも幅広く利用されている。ブルーベリー類の機能性として、眼科領域では暗下での視力回復の促進効果<sup>1</sup>、網膜色素や角膜上皮細胞の保護作用<sup>2,3</sup>などが報告されている。また、ポリフェノールの抗酸化能による体内の活性酸素の除去作用<sup>4,5</sup>や、肝臓の酸化ストレスや肝硬変の抑制作用も報告されている<sup>6</sup>。しかしながら、ブルーベリー類の抗ウイルス作用についての報告は少ない<sup>7,8</sup>。

ブルーベリー類を含めて、小粒の漿果をつける果樹はベリー類と総称される。ベリー類の一つで、加工食品に広く利用されるブラックカラント（カシス）の抗ウイルス作用についても複数の報告があり、単純ヘルペスウイルス 1 型や RS ウイルス<sup>9,10</sup>、インフ

ルエンザウイルス（以下 IFV）<sup>11,12</sup>に感染阻害活性があることが報告されている。また、肺炎レンサ球菌やインフルエンザ菌に対する抗菌作用<sup>10</sup>も報告されている。しかし、ブラックカラントはユキノシタ目スグリ科スグリ属であるのに対し、ブルーベリー類はツツジ目ツツジ科スノキ属であり、植物学的には異なるため、果実に含まれるポリフェノール等の成分にも差があると考えられる。また、ブルーベリーには非常に多くの栽培品種と近縁の野生種があり、品種によって機能性の有無や強弱に差があると考えられる。

そこで本研究ではブルーベリー類の抗 IFV 作用に着目し、培養細胞への IFV 感染の初期段階の感染阻害活性について、ブルーベリー 35 品種とその近縁の野生種 3 種、さらにブラックカラントを加えて比較した。また、IFV 感染阻害活性の高かったナツハゼ果実を用いて実験を行い、IFV 感染阻害活性を示す成分の探索を実施した。

さらに、IFV には複数の型や株が存在し、ブルーベリー類の抗 IFV 作用は異なる可能性が考えられた

ため、型や株の異なるウイルスに対するブルーベリー類の感染阻害活性を調べた。

ナツハゼは国内の低山地に自生しているブルーベリーと同じツツジ科スノキ属の野生種であり、現在は主に庭木や生け花の材料として流通している。近年、福島県内においてナツハゼ果実を特産品として利用する動きがあり、徐々にではあるが、果実として流通するようになってきた。クエン酸を多く含むため酸味が強く、アントシアニンに由来する非常に濃い紫色が特徴であり、加工品等への利用が期待されている。

そこで、ブルーベリー類果実の機能性を活かした食品への利用方法を明らかにするため、ナツハゼ果実を用いて、加工素材の製造方法や食品への応用方法について試験を実施した。

## 第2章 ブルーベリー品種間のIFV感染阻害活性の比較

### 2.1 方法

#### 2.1.1 試料

福島県会津若松市北会津町で採取されたブルーベリー果実35品種(北部ハイブッシュ系25種、南部ハイブッシュ系1種、ラビットアイ系7種、半樹高ハイブッシュ系2種)と、福島県田村市都路町で採取されたナツハゼ1種、北欧産ビルベリーとニュージーランド産ブラックカラント、アメリカ産クランベリーの冷凍輸入果実を用いた。果実は冷凍保存し、実験に供する際に解凍した。その後、50 mLチューブに最終40%濃度となるように果実と蒸留水を加えてホモジナイズし、100°Cで10分間加熱した後に遠心分離して得られた果汁を試験に供試した。

#### 2.1.2 細胞とウイルス

実験にはMDCK(イヌ腎臓尿細管上皮)細胞を用いた。MDCK細胞はIFVに対する感受性が高く、臨床検体からのウイルス分離にも用いられており、IFVの実験で一般的に用いられる細胞である。細胞培養には4%のウシ胎児血清(Sigma-Aldrich, MO, USA)と3種の抗生物質(300 µg/mLストレプトマイシン(Meiji Seikaファルマ株式会社、東京)、300 U/mLペニシリン(Meiji Seikaファルマ株式会社、東京)、1 µg/mLアンフォテリシンB(ブリストル・マイヤーズ株式会社、東京))を含むダルベッコ変法イーグル培地(日水製薬株式会社、東京)(以下DMEM/FCS)を用いた。

IFVは2009-2010シーズンに山形県で分離されたA/Yamagata/165/2009pdmを用いた。このウイルスは2010年に山形県衛生研究所から分与されたものをMDCK細胞に感染させて37°Cで3日間培養し、その培地を3000rpmで10分間遠心分離後に上清をマイクロチューブに分注して-80°Cで保存していたも

のである。感染価は $1.5 \times 10^7$  pfu/mLであった。

#### 2.1.3 IFV感染阻害活性の評価

ウイルスの感染阻害として感染の初期段階に着目した。本研究では果汁を含む飴を食した場合などを想定し、ウイルスと活性成分が同時に細胞上に存在する条件を設定、以下の方法で感染阻害活性を評価した。

DMEM/FCSに混合したMDCK細胞をプラスチック製細胞培養用12ウェルプレートに1 mL/ウェル播種し、37°Cに設定したCO<sub>2</sub>インキュベーターで3日間、単層培養した。実験時にプレートの培養液を除去し、4%のウシ血清アルブミン(Roche, Basel, Switzerland)と3種の抗生物質(前述)を含むダルベッコ変法イーグル培地(以下DMEM/BSA)で10000、1000、100 pfuに希釈したウイルス液とDMEM/BSA(対照)を横列に、10%、3%、1%濃度に希釈した果汁を縦列に、ウイルス濃度と果汁濃度がそれぞれ異なる組み合わせとなるよう、200 µL/ウェルずつ同時に加え、室温で攪拌しながら5分間感染させた。その後5分経過したウェルから順にウイルス液と果汁の混合液を除去、DMEM/BSAで細胞を洗浄した後、1%アガロース(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)と1 µg/mLトリブシン(Sigma-Aldrich, MO, USA)を含むDMEM/BSAを2 mL/ウェル重層した。37°Cに設定したCO<sub>2</sub>インキュベーターで3日間培養した後、10%ホルマリンで細胞を固定、ゲルを除去して0.05%クリスタルバイオレットで染色した。感染阻害活性は対照のプラーク数と比較してプラーク数を50%抑制する果汁濃度をIC<sub>50</sub>として算出した。実験は3回繰り返して行った。

#### 2.1.4 総ポリフェノール含量の測定

総ポリフェノール含量はフォリン・チオカルト法で測定した<sup>13</sup>。96穴マイクロプレートに試料10 µLと蒸留水60 µLを加え、その後蒸留水で2倍希釈したフォリン・チオカルト試薬(メルク、フランクフルト、ドイツ)を15 µL添加して攪拌、5分後に2%炭酸水素ナトリウム水溶液を75 µL添加して攪拌、室温で15分間反応させた後に750 nmの吸光度を測定した。標準品には没食子酸(和光純薬工業株式会社、大阪)を用い、没食子酸換算で算出した。

## 2.2 結果

### 2.2.1 IFV感染阻害活性の品種比較

IFVの感染を50%阻害する果汁濃度を表すIC<sub>50</sub>は低いほど感染阻害活性が高いことを表している(表1)。栽培種のブルーベリーにおいてはエリオット、レイトブルー、オースチン、バルドウィン、ブライトブルー、フェスティバル、ノビリス、ティフブルーで低く、総じてラビットアイ系のブルーベリーのIFV感染阻害活性が高い傾向を示した。また、野生

種であるナツハゼとブラックカラントでは1%以下と最も低かった。また、ビルベリーやクランベリーも低い値を示した。

## 2.2.2 総ポリフェノール含量と IFV 感染阻害活性の関係

総ポリフェノール含量は、栽培種のブルーベリーにおいてはエリオット、レイトブルー、ルーベル、オースチン、バルドウィン、ブライトブルー、フェスティバル、ノビリス、ティフブルーが高く、ナツハゼ、ビルベリー、ブラックカラントの含有量はさらに高かった(表1)。これらの種および品種はIFV感染阻害活性の高かった種および品種とほぼ同じであったため、総ポリフェノール含量とIFV 50%感染阻害濃度(IC<sub>50</sub>)を比較したところ、総ポリフェノール含量が多くなるとIC<sub>50</sub>は低くなることが確認された。このことは総ポリフェノール含量とIFV感染阻害活性には正の相関関係があることを示している(図1)。ブルーベリー類のポリフェノール含量の差は、品種等の差および果皮の量が大きく影響していると考えられる。ビルベリーやナツハゼ、一部の栽培種では果肉にもアントシアニンが含まれているため、ポリフェノール含量は品種等によって差がある。さらに、ポリフェノールは果皮に多く含まれているが、種および品種によって果皮の厚さが異なり、また、ブルーベリーにおける調査では同一品種の場合は果実粒の大きさと単位重量当たりのアントシアニン含量には負の相関があることが確認されている<sup>14</sup>。IFV感染阻害活性の高いナツハゼやビルベリーでは果実粒がかなり小さいことから、ブルーベリー類のIFV感染阻害活性にはこれらの要因が影響していると考えられた。

## 第3章 ナツハゼ果実に含まれる IFV 感染阻害活性成分の探索

### 3.1 方法

#### 3.1.1 試料

福島県田村市都路町で採取されたナツハゼ果実を用いた。果実は採取後すぐに洗浄し、冷凍保存した。

#### 3.1.1.1 合成吸着樹脂によるナツハゼ果実抽出物の分離

冷凍されたナツハゼ果実を凍結乾燥し、粉砕後に80%エタノールを添加、5°Cで一晩静置した。その後、8000×gで10分間遠心分離して上清を回収し、減圧下で濃縮乾固してエタノール抽出物を得た。

エタノール抽出物5gを50mLの蒸留水に溶解し、ガラスカラム(直径20mm×長さ300mm)に充填した20gの合成吸着樹脂(DIAION HP-20、三菱ケミカル株式会社、東京)に吸着させた。その後、蒸留水とエタノール水溶液(10%、20%、30%、40%、50%、80%)を用いて抽出物の分離および分取を行った。

分取したそれぞれの画分は濃縮乾固し、重量を測定した。

得られた画分は20%ジメチルスルホキシド(ナカライテスク株式会社、京都)水溶液に溶解し、それ

表1 ベリー類のIFV感染阻害活性と総ポリフェノール含量

品種	IFV感染阻害活性 IC <sub>50</sub> (果汁濃度%)	総ポリフェノール含量 3%果汁 (μg/ml)	
あまつぶ星	>10	26.0	
アトランティック	>10	25.6	
パークレイ	>10	31.7	
ブルーチップ	3.05	35.9	
ブルークローブ	5.86	21.9	
ブルーレイ	>10	25.8	
ブリジダ	>10	22.2	
コリンズ	4.92	26.1	
ダロウ	7.06	27.0	
デューク	>10	35.5	
アーリーブルー	4.87	33.1	
エリザベス	>10	25.9	
エリオット	1.28	53.3	
はやばや星	>10	28.9	
ひとみ	6.20	27.7	
ジャージー	>10	30.9	
レイトブルー	1.63	46.1	
レガシー	3.21	40.6	
ネルソン	>10	26.5	
おおつぶ星	6.04	21.7	
ルーベル	4.25	49.1	
シエラ	>10	30.8	
スバルタン	>10	23.4	
ウェイマウス	>10	24.0	
エックス(仮称)	>10	31.9	
ブルーベリー (北部ハイブッシュ系)	シャープブルー	6.13	24.2
ブルーベリー (南部ハイブッシュ系)	チップワ	>10	23.0
ブルーベリー (半樹高ハイブッシュ系)	ノースランド	5.22	35.6
	オースチン	2.60	56.1
	バルドウィン	2.58	51.0
	ブライトブルー	1.46	57.2
ブルーベリー (ラビットアイ系)	デライト	>10	24.9
	フェスティバル	2.18	56.1
	ペリス	1.44	45.8
	ティフブルー	2.53	55.9
ナツハゼ	-	<1	80.7
ビルベリー	-	1.99	72.7
ブラックカラント	-	<1	80.4
クランベリー	-	2.18	26.7

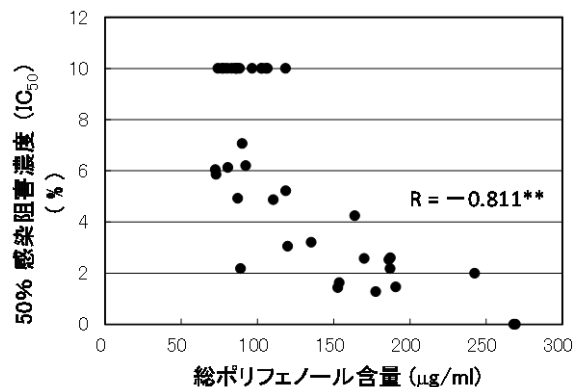


図1 ベリー類果実の50%IFV感染阻害濃度と総ポリフェノール含量の関係

ぞれ 1 mg/mL の濃度になるよう調製した。このようにして得た合成吸着樹脂画分を、総ポリフェノール含量、総アントシアニン含量および IFV 感染阻害活性の評価に用いた。

### 3.1.1.2 HPLC によるナツハゼ果実エタノール抽出物の分離

冷凍されたナツハゼ果実を解凍し、0.1%ペクチナーゼ（ペクチナーゼ SS、ヤクルト薬品工業株式会社、東京）を加えてミキサーでペースト状になるまで攪拌し、40°C で 2 時間、酵素反応させた。その後 8000×g で 10 分間遠心分離し、上清を得た。得られた上清は先述した合成吸着樹脂（DIAION HP-20）に添加し、蒸留水を流して糖類などの水溶性の物質を除去後、80%エタノール水溶液を流して合成吸着樹脂に吸着した物質を含むエタノール溶液を回収した。回収したエタノール溶液は減圧濃縮と凍結乾燥により粉末化し、ナツハゼ果実抽出物とした。エタノール抽出物は 10 mg/mL になるように蒸留水に溶解し、UV/VIS 検出器を接続した高速液体クロマトグラフ（L-2000、株式会社日立ハイテクノロジーズ、東京）を用いて成分の分離と分取を行った。分離条件は以下の通りである。カラム：Develosil ODS-HG-5（4.6 mm×150 mm、5 μm、野村化学株式会社、愛知）、検出波長：326 nm、カラムオープン温度：40°C、流速：1 mL/min、移動相：エタノール水溶液（0-10 分は 5% を維持、10-50 分にかけて 40% まで濃度を上昇させ、50-55 分にかけて 5% に下降、その後平衡化するために 55-65 分を初期条件である 5% で維持）。以上を 1 サイクルとし、手動で目的とするピークに分取を繰り返した。

得られた画分は減圧乾固後に重量を測定し、20% ジメチルスルホキシド水溶液に溶解し、それぞれ 1 mg/mL の濃度になるよう調製した。このようにして得た HPLC 分取画分を、総ポリフェノール含量および IFV 感染阻害活性の評価に用いた。

### 3.1.2 細胞とウイルス

2.1.2 に同じ。

### 3.1.3 IFV 感染阻害活性の評価

2.1.3 に同じで、実験サンプルには DMEM/BSA で 250、75、25 μg/mL 濃度に希釈した分画試料を用いた。

### 3.1.4 総ポリフェノール含量の測定

2.1.4 に同じ。

### 3.1.5 総アントシアニン含量の測定

総アントシアニン含量は吸光度法で測定した<sup>14</sup>。96 穴マイクロプレートに試料 30 μL と 5% トリフルオロ酢酸水溶液を 120 μL 加え、530 nm の吸光度を測定した。標準品にはシアニジン-3-グルコシド（和

光純薬工業株式会社、大阪）を用い、シアニジン-3-グルコシド換算で算出した。

### 3.1.6 ESI-LC/MS による IFV 感染阻害活性成分の分子量の測定

HPLC で分取したナツハゼ抽出物の分子量推定には、エレクトロスプレーイオン化質量分析計（LTQ Orbitrap Veros pro、Thermo Fisher Scientific、MA、USA）を、分離にはダイオードアレイ検出器が付属した超高速液体クロマトグラフ（Ultimate 3000 RSLC、Thermo Fisher Scientific、MA、USA）を用いた。分離条件は以下の通り。カラム：ACQUITY UPLC HSS C18 column（2.1 mm×100 mm、1.8 μm、Waters、MA、USA）、検出波長：200-750 nm、カラムオープン温度：40°C、流速：0.3 mL/min、移動相：A 液（0.1% 酢酸水溶液）および B 液（0.1% 酢酸含有アセトニトリル）の 2 液グラジェント（B 液について、0-1 分は 5% を維持、1-9 分にかけて 80% まで上昇、9-19 分にかけて 50% に下降させ、その後平衡化するために 19-29 分を初期条件である 5% で維持）。

分取したナツハゼ抽出物は分析カラムで分離し、ダイオードアレイ検出器を通過した後に質量分析計に供した。質量分析計のパラメータは以下の通りである。スプレー電圧値：3.0 kV、ソースヒーター温度：400°C、キャピラリー温度：230°C、シースガス流量：40（任意単位）、オグジリラリガス流量：5（任意単位）、分解能：10000、マスレンジ： $m/z$  100-1000。

## 3.2 結果

### 3.2.1 ナツハゼ果実抽出物分離画分に含まれるポリフェノールと IFV 感染阻害活性の関係

ナツハゼ果実抽出物を吸着させた合成吸着樹脂から濃度の異なるエタノール水溶液を用いてポリフェノールを分離・分取し、得られた重量、IFV 感染阻害活性、総ポリフェノール含量および総アントシアニン含量を測定した（表 2）。回収量は水画分が最も多いが、これは樹脂に吸着しない糖類などの水溶性の物質が主であると考えられる。

総ポリフェノール含量は 10% から 50% 画分までは 330 から 445 μg/mL の範囲であり、顕著な差はなかったが、総アントシアニン含量は 10% と 20% 画分でそれぞれ 439 μg/mL、377 μg/mg となり、アントシアニン全体の 67% が 10% と 20% 画分に含まれていることが確認された。このことから、30%、40%、50% 画分にはアントシアニン以外のポリフェノールが多く含まれていることが明らかとなった。

一方、感染阻害活性は水画分とエタノール 10% 画分では確認できなかったが、20% 画分以降で確認され、特に 30%、40%、50% 画分で高い活性を示すことが確認された。

それぞれの画分を HPLC で分析したところ、10%

と 20%画分では溶出時間の短いところに大きなピークが確認された。このピークはナツハゼ果実に大量に含まれているアントシアニンやクロロゲン酸であることを HPLC によって別途確認している。一方、30%、40%、50%画分では 35 分から 45 分にかけて 3 つの特徴的なピークが確認された (図 2)。

この結果、ナツハゼ果実に含まれているアントシアニンやクロロゲン酸には強い IFV 感染阻害活性はなく、エタノール濃度 30%、40%、50%画分に含まれているポリフェノールが感染阻害活性に關与する主要な成分であることが明らかとなった。

次に、高い感染阻害活性を示す成分を明らかにするため、エタノール濃度 30%、40%、50%画分に含まれていた 3 つのピークを HPLC と ODS カラムを用いて分取し、それぞれを画分 A、B、C とした (図 3)。分取量は画分 A が 7.6 mg、画分 B が 3.1 mg、画分 C が 4.2 mg となり、重量あたりの総ポリフェノール含量は画分 C が最も高かった。しかし IFV 感染阻害活性は画分 A と B が高く、画分 C はそれらの 1/6 程度であった (表 3)。

表 2 合成吸着樹脂によるナツハゼ果実抽出物の分離

画分	カラム通液量 ( mL )	画分採取量 ( mg )	総ポリフェノール 含量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	総アントシアニン 含量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	IFV感染阻害活性 ( $\text{IC}_{50}$ ) ( $\mu\text{g/mL}$ )
水	200	2867	28	2	ND
10% エタノール	100	76	415	439	ND
20% エタノール	100	114	445	377	159
30% エタノール	100	47	400	149	38
40% エタノール	100	20	327	80	22
50% エタノール	100	3	330	90	65
80% エタノール	200	4	191	91	85

表 3 HPLC によるナツハゼ果実抽出物の分離

画分	画分採取量 ( mg )	総ポリフェノール 含量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	IFV感染阻害活性 ( $\text{IC}_{50}$ ) ( $\mu\text{g/mL}$ )
A	7.6	228	38
B	3.1	278	40
C	4.2	371	238

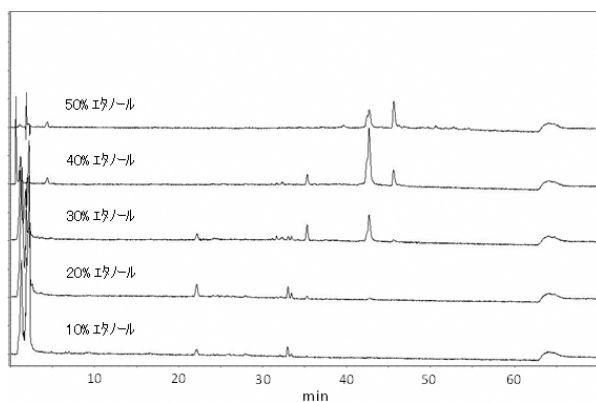


図 2 合成吸着樹脂によって分離したナツハゼ画分の HPLC クロマトグラム

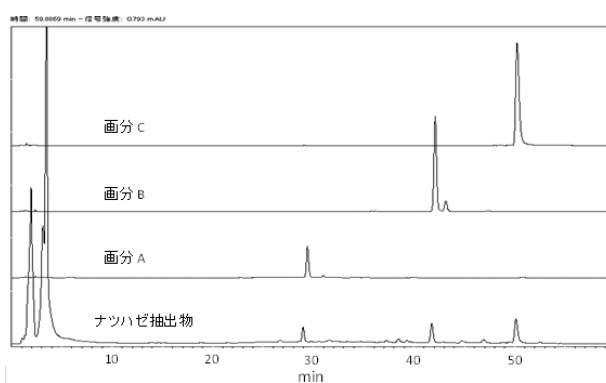


図 3 HPLC によって分取した IFV 感染阻害活性を有する画分のクロマトグラム



### 3.2.2 ESI-LC/MS による IFV 感染阻害活性成分の分子量の測定

HPLC で分画された画分 A、B、C を ESI-LC/MS で分析した (表 4)。ESI-LC/MS で分離した際のクロマトグラムは、先の合成吸着樹脂による分離のクロマトグラムとは少し異なっている (図 4)。これは使用したカラムが異なることや検出波長が 220 から 750 nm の積算値を用いていることによる。各画分には複数のピークが存在しており、画分 A に含まれるピークを #1、#2、#3、画分 B に含まれるピークを #4、#5、画分 C のピークを #6 と #7 とした。

ピーク #1 は 7.1 分に検出され、ネガティブイオンモードで  $m/z$  577、ポジティブイオンモードで  $m/z$  579 に主要イオンのマススペクトルを得た。また、MS/MS により [M-H]<sup>-</sup> が  $m/z$  451、425、407 および 289、[M+H]<sup>+</sup> が  $m/z$  427、429 および 291 のプロダクトイオ

ンを得た。さらに、ピーク #1 の UV/VIS スペクトルの吸収極大は 279 nm であった。これらの結果は、ピーク #1 がプロシアニジン B1 や B2 などのエピカテキンの二量体であることを示している。そこで、市販のプロシアニジン B2 の標準品の分子量や MS/MS スペクトル、UV/VIS スペクトルを比較した結果、ピーク #1 はプロシアニジン B2 であることが明らかとなった。

ピーク #2 は 7.45 分に、#3 は 7.99 分に検出され、ネガティブイオンモードによるそれらの主要イオンと MS/MS スペクトルはほぼ同様であった。これらのピークの主要イオンの [M-H]<sup>-</sup> は  $m/z$  355 で、プロダクトイオンは  $m/z$  295 ([M-H-60]<sup>-</sup>)、235 ([M-H-120]<sup>-</sup>)、217 ([M-H-120-18]<sup>-</sup>)、193 ([M-H-162]<sup>-</sup>)、および 175 ([M-H-162-18]<sup>-</sup>) であった。UV/VIS スペクトルもほぼ同じであり、吸収極大は 329 nm 付近であった。一

表 4 ESI-LC/MS 分析による IFV 感染阻害成分の推定

画分	ピーク No.	溶出時間 (min.)	UV ( $\lambda$ max) (nm)	ESIモード	プリカーサーイオン ( $m/z$ )	プロダクトイオン ( $m/z$ )	推定物質
A	#1	7.10	279	(-) (+)	577 579	451, 425, 407, 289 427, 429, 291	procyanidin B2
	#2	7.45	329	(-) (+)	355 ND	295, 235, 217, 193, 175 no information	ferulic acid derivatives
	#3	7.99	325	(-) (+)	355 ND	295, 235, 217, 193, 175 no information	ferulic acid derivatives
B	#4	11.05	315	(-) (+)	355 357	193 195, 163	ferulic acid <i>O</i> -hexosides
	#5	11.46	307	(-) (+)	355 357	193 195, 163	ferulic acid <i>O</i> -hexosides
C	#6	12.47	349	(-) (+)	447 449	301 303	quercetin <i>O</i> -rhamnoside
	#7	12.55	349	(-) (+)	579 581	300 449	quercetin <i>O</i> -pentoside + <i>O</i> -rhamnoside

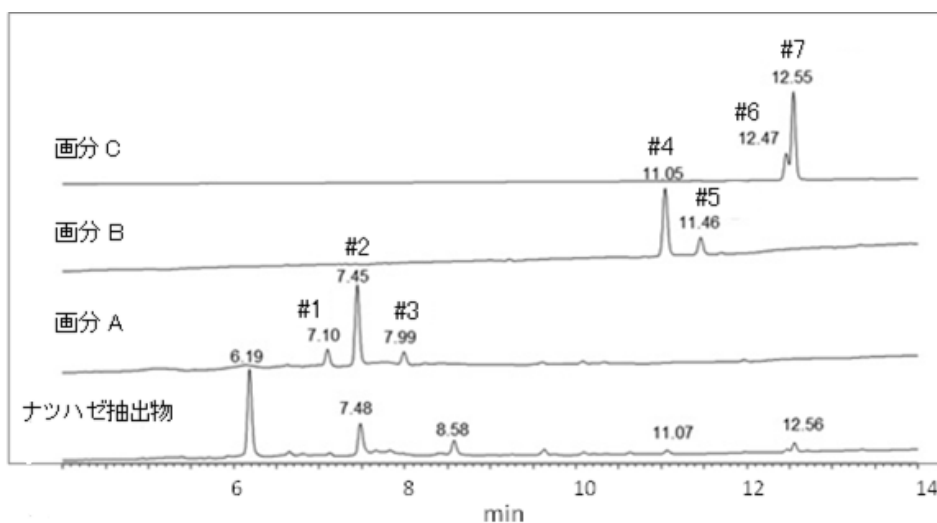


図 4 分取した IFV 感染阻害活性を有する画分の ESI-LC/MS 分析

方、これらのピークのポジティブイオンモードによる主要イオンと MS/MS スペクトルからは有用な情報を得ることはできなかった。黒ニンジンの研究で、フェルラ酸誘導体の主要イオンの[M-H]<sup>+</sup>は  $m/z$  355、プロダクトイオンは  $m/z$  295、217、193、175 および 134 であり、吸収極大は 330 nm であったと報告されている<sup>16</sup>。このことから、今回得られたピーク #2 と #3 はフェルラ酸誘導体であることが明らかとなった。

ピーク #4 と #5 はそれぞれ 11.05 分と 11.46 分に検出され、主要イオンの[M-H]<sup>+</sup>は  $m/z$  355 であった。しかし、MS/MS スペクトルはピーク #2 と #3 と異なっていた。 $m/z$  355 の[M-H]<sup>+</sup>は  $m/z$  193 ([M-H-162]<sup>+</sup>) に顕著なプロダクトイオンを与えた。このパターンは乾燥プラム<sup>17</sup>およびハーブ<sup>18</sup>の研究では、フェルラ酸六炭糖であると報告されている。このことから、画分 B の主要なピークはフェルラ酸六炭糖であることが明らかとなった。

ネガティブイオンモードにおいて、ピーク #6 は 12.47 分に、#7 は 12.55 分に検出され、主要イオンはそれぞれ  $m/z$  447 と  $m/z$  579 に確認された。また、ポジティブイオンモードにおいて、ピーク #6 と #7 の主要イオンは  $m/z$  449 と  $m/z$  581 にそれぞれ確認され、プロダクトイオンは  $m/z$  303 ([M+H-146]<sup>+</sup>) と  $m/z$  449 ([M+H-146]<sup>+</sup>) にそれぞれ確認された。ピーク #7 の MS/MS スペクトルについては、#6 で確認されたフラグメンテーションパターンと似ていた。また、 $m/z$  449 以外のプロダクトイオンは、 $m/z$  431 ([M+H-132-18]<sup>+</sup>)、413 ([M+H-132-18x2]<sup>+</sup>)、345 および 303 ([M+H-132-146]<sup>+</sup>) に確認された。さらにピーク #6 と #7 の UV/VIS スペクトルの吸収極大は 349 nm 付近であった。これらのデータから、ピーク #6 と #7 が、それぞれケルセチン-3-O-ラムノシドやケルセチン-O-ペントシド-O-ラムノシドのようなケルセチン配糖体であることが明らかとなった<sup>19</sup>。

## 第4章 異なるウイルス型・株が IFV 感染阻害活性に及ぼす影響

### 4.1 方法

#### 4.1.1 試料

福島県会津若松市北会津町で採取されたブルーベリー2品種、エリオット(北部ハイブッシュ系)とフェスティバル(ラビットアイ系)、福島県田村市都路町で採取されたナツハゼ、冷凍輸入された北欧産ビルベリーとアメリカ産クランベリー、ニュージーランド産ブラックカラント計6品種の果実を用いた。果実は冷凍保存し、それぞれの実験に供する際に解凍した。その後の処理は2.1.1に同じ。

#### 4.1.2 細胞とウイルス

細胞は2.1.2に同じく MDCK 細胞を用い、ウイル

スは A 型 IFV の AH1pdm(A/Yamagata/165/2009pdm) に加え、A 型でタミフルに耐性を持つ AH1tam<sup>r</sup>(A/Yamagata/5/2009)、A 香港型と呼ばれる AH3(A/Yamagata/72/2009)、さらに B 型 IFV の B(B/Yamagata/89/2009)の4種の株を用いた。

### 4.1.3 IFV 感染阻害活性の評価

2.1.3に同じ。

### 4.1.4 総ポリフェノール含量の測定

2.1.4に同じ。

## 4.2 結果

### 4.2.1 IFV 感染阻害活性のウイルス型・株の比較

10%果汁では、ナツハゼ、ブラックカラント、ビルベリー、クランベリーにおいてはウイルス型に関係なく IFV の感染をほぼ 100%阻害した。一方、栽培種であるエリオットとフェスティバルにおいては、AH1pdm と B に対しては 90%以上阻害したが、AH1tam<sup>r</sup> と AH3 に対する阻害率は低かった。また、3%果汁や1%果汁においてはナツハゼ、ブラックカラント、ビルベリー、クランベリーでも同じような傾向が示され、IFV 感染阻害活性は、AH1pdm と B に対しては高く、AH1tam<sup>r</sup> と AH3 に対しては低いことが明らかとなった。(図5)。

### 4.2.2 総ポリフェノール含量と IFV 感染阻害活性の関係

総ポリフェノール含量はナツハゼとブラックカラントが高く、次いでビルベリー、フェスティバル、エリオットとなり、クランベリーが最も低かった(図6)。

総ポリフェノールと IFV 感染阻害活性を比較すると、総ポリフェノール含量が高い品種では IFV 感染阻害活性も高い傾向があり、AH1pdm と B でより顕著に確認された。ただし、クランベリーでは総ポリフェノール含量が低めであるにも関わらず IFV 感染阻害活性は高かった。

## 第5章 ナツハゼ果実の加工方法と IFV 感染阻害活性

### 5.1 方法

#### 5.1.1 試料

福島県田村市都路町で採取されたナツハゼ果実を用いた。果実は冷凍保存し、実験に供する際に解凍した。

加工方法については果汁素材を想定し、以下の6区を設定し、得られた果汁素材は 8000rpm で遠心分離し、上清を採取して実験用のサンプルとした。

ミキサー処理区(40%濃度になるように冷凍果実に水を加えてミキサー処理)、100°C10分加熱区(40%濃度になるように冷凍果実に水を加え、ミキ



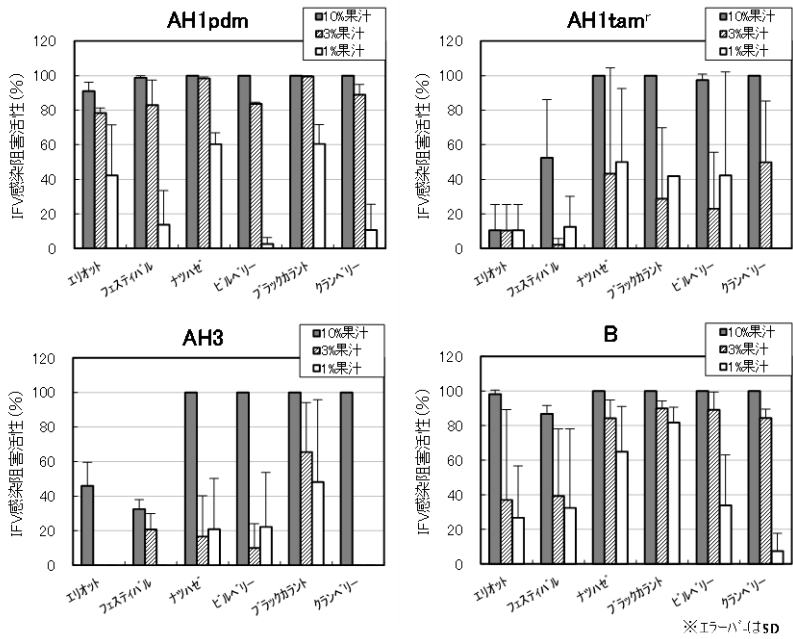


図5 IFV の型・株の違いと各種ベリー類果実果汁の感染阻害活性

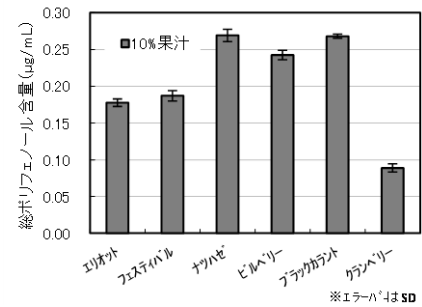


図6 ベリー類果実の総ポリフェノール含量

サー処理後に沸騰水中で 100°C、10 分加熱)、130°C 30 分加熱区 (40%濃度になるように冷凍果実の水を加え、ミキサー処理後にオートクレーブで 130°C 30 分加熱)、凍結乾燥熱水抽出区 (果実を凍結乾燥後に粉砕し、生果実換算で 40%濃度となるように熱湯を加えて 10 分間攪拌抽出)、60°C乾燥熱水抽出区 (果実を 60°C乾燥後に粉砕し、生果実換算で 40%濃度となるように熱湯を加えて 10 分間攪拌抽出)、ペクチナーゼ処理区 (40%濃度になるように冷凍果実の水を加え、ミキサー処理後にペクチナーゼを 0.1%添加し、40°Cで 3 時間反応させた後にろ過)。

また、ナツハゼ果実を使用した加工品として、凍結乾燥果実を粉砕機 (ワンダーブレンダー、大阪ケミカル、大阪) で微粉砕した凍結乾燥粉末と果汁素材を 1%含有した「飴」を試作した。なお、飴に用いた果汁素材の処理方法および飴の加工方法は以下のとおり。果汁素材の処理方法は、鍋にナツハゼ果実とそれと等量の水を入れ、果実をよくつぶしながら 10 分間加熱、ろ過したものを 50%果汁とした。また、飴の加工については、グラニュー糖 : 水飴 = 6 : 7 で混合したものを基本の飴とし、ナツハゼ果実の凍結乾燥粉末と 50%果汁を最終濃度 1%となるように混合した。混合した原料は鍋で加熱しながら溶解・攪拌し、150°Cに達した時点で型枠に流し入れて飴とした。

### 5.1.2 細胞とウイルス

2.1.2 に同じ。

### 5.1.3 IFV 感染阻害活性の評価

2.1.3 に同じ。

### 5.1.4 総ポリフェノール含量の測定

2.1.4 に同じ。

### 5.1.5 総アントシアニン含量の測定

4.1.5 に同じ。

## 5.2 結果

### 5.2.1 果汁素材の IFV 感染阻害活性と総ポリフェノールおよび総アントシアニン含量

IFV 感染阻害活性は、5%果汁ではミキサー処理区と、130°C30 分加熱区において、他の区よりもやや低い傾向があった、それ以外はいずれも 90%以上の高い阻害活性が確認された。また、いずれの処理区においても果汁濃度が 3%、1%と薄くなるにつれて活性も低くなった (図 7)。

総ポリフェノール含量は凍結乾燥熱水抽出区、60°C乾燥熱水抽出区が多かった。次いで 100°C10 分加熱区、130°C30 分加熱区、ペクチナーゼ処理区の順であり、ミキサー処理区が最も少なかった。また、総アントシアニン含量は、凍結乾燥熱水抽出区で最も多く、次いで 60°C乾燥熱水抽出、100°C10 分加熱区、ペクチナーゼ処理区が同程度、ミキサー処理区はそれらよりも少なかった。総アントシアニン含量が最も低かった区は 130°C30 分加熱区であり、これは過度の加熱によってアントシアニンの構造が変化したことが原因であると考えられた (図 8)。

以上のことから、乾燥果実からの熱水抽出および

ペクチナーゼを使用した加工方法の IFV 感染阻害活性が高く、また、ナツハゼ果実の IFV 感染阻害活性は加熱処理しても保持されることが明らかとなった。

5.2.2 ナツハゼ飴の IFV 感染阻害活性と総ポリフェノールおよび総アントシアニン含量

試作した飴の外見を比較すると、粉末 1% 飴ではアントシアニン由来の紫色が非常に濃く、果汁 1% 飴ではきれいな紫色となった。一方、対照となるナツハゼ無添加の飴は無色透明であった (図 9)。ナツハゼ果実に含まれるアントシアニンを始めとするポ

リフェノールは果皮に多く含まれているため、ミキサー処理と遠心分離によって搾汁した果汁素材ではポリフェノール含量が少なく、色が薄くなったと考えられた (図 10)。

これらの飴を 10 倍希釈した場合の IFV 感染阻害活性は、粉末 1% 飴で 80% 以上、果汁 1% 飴では 40% 程度、対照では活性は確認されなかった。また、希釈倍率が高くなると感染阻害活性は低くなった (図 11)。飴の加工には 100°C 以上の高温処理が伴うが、そのような条件下においてもナツハゼ果実の IFV 感染阻害活性は保持されることが明らかとなった。

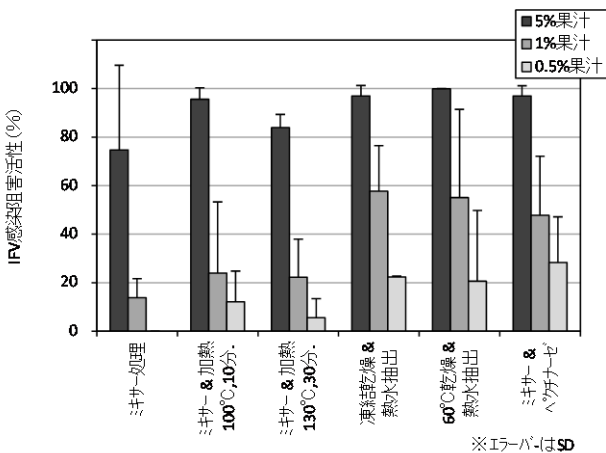


図 7 ナツハゼ果汁素材の加工方法および濃度による IFV 感染阻害活性

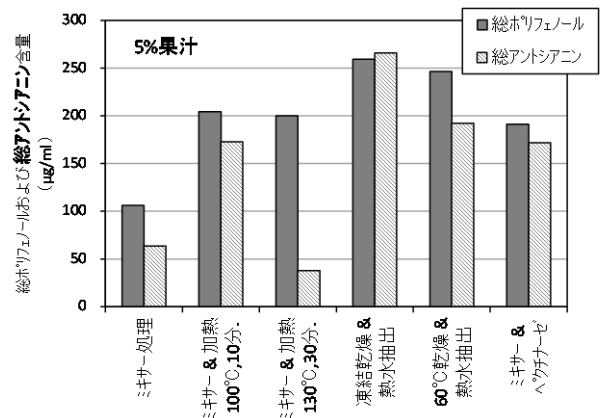


図 8 ナツハゼ果汁素材の総ポリフェノール含量とアントシアニン含量



図 9 ナツハゼ果実の加工素材を利用した飴

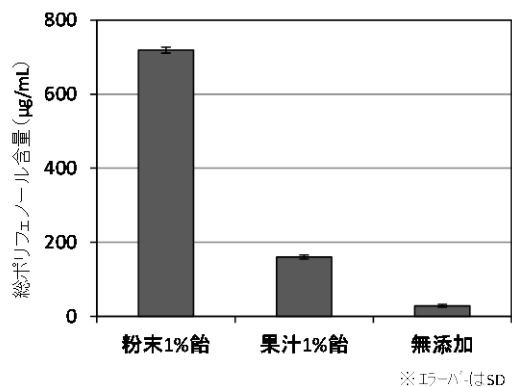


図 10 ナツハゼ果実の加工素材を利用した飴の総ポリフェノール含量

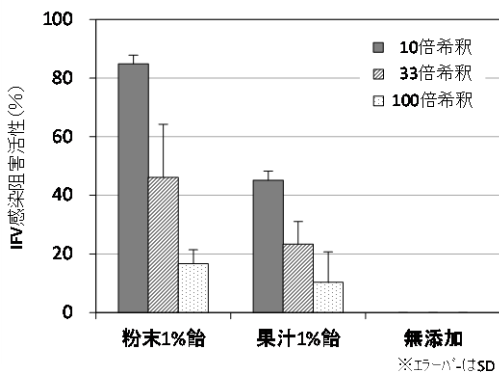


図 11 ナツハゼ果実の加工素材を利用した飴の IFV 感染阻害活性

## 第6章 考察

ブラックカラント<sup>10,11,12</sup>やアロニア<sup>20</sup>、エルダーベリー<sup>21</sup>、クランベリー<sup>22</sup>といったベリー類果実には抗IFV作用があると報告されており、これらの果実に含まれるポリフェノール類が抗ウイルス効果を示すことについても報告されている<sup>23,24</sup>。ブルーベリー類においてもポリフェノールを多く含むことは既に知られており、抗IFV作用が期待されたが、栽培種であるブルーベリーの品種は非常に多く存在することから、本研究ではIFV感染阻害活性について品種比較を行うことから研究をスタートした。その結果、IFV感染阻害活性は品種によって大きく異なることが明らかとなり、総ポリフェノール含量と正の相関があることが確認された<sup>25</sup>。ブルーベリーのポリフェノール含量は品種によって差があるが、ポリフェノールは果皮に多く含まれているため、果皮が厚めであるラビットアイ系や小粒の品種においては重量当たりの果皮の割合が高くなり、IFV感染阻害活性も高くなることが期待できる。日本でのブルーベリー栽培は摘み取り農園での栽培が多く、大粒で果皮が口に残らない、食べやすい品種の人气が高いが、本研究の結果は果皮が厚い品種や小粒な品種にも関心を向けるきっかけとなり得る。また、それらポリフェノールを多く含む品種はアントシアニンの量も多いため、加工した際にはブルーベリーの特徴である紫色を活かした加工品の開発が可能であると考えられた。

次に、IFV感染阻害活性にはポリフェノールが関与している可能性が示されたことから、関与しているポリフェノールの同定を試みた。ブルーベリー類にはアントシアニンが多く含まれており、アントシアニンにはIFV感染阻害活性があることが知られている<sup>12</sup>。しかしながら、本研究においてナツハゼ抽出物を合成吸着樹脂で分離した結果、アントシアニンよりも高いIFV感染阻害活性を示すポリフェノールが存在する可能性が示された。それらのポリフェノールを同定するために、ナツハゼ果実からIFV感染阻害活性を有する3つの画分A、B、Cを分取し、ESI-LC/MSによる分析を行った結果、それらにはフェルラ酸誘導体、プロシアニジンB2およびケルセチン配糖体が含まれていることを明らかにした<sup>26</sup>。

ポリフェノールと抗IFV作用については様々な報告があるが、本研究で評価した感染初期段階における阻害作用においては、フェルラ酸についてはノイラミニダーゼに結合してIFV感染の初期段階を阻害し、特にその誘導体はより強い効果を示すことが報告されている<sup>27</sup>。また、プロシアニジンB2とケルセチン配糖体に関しては、感染後の細胞内でのIFV複製を阻害することが報告されているが<sup>28,29</sup>、IFV感染の初期段階では効果が確認できなかったことが報告されている<sup>30</sup>。これらの結果から、ナツハゼには

抗IFV活性を有するポリフェノールがいくつか含まれているが、本研究で評価した感染初期段階のIFV阻害についてはフェルラ酸誘導体の寄与が大きいと考えられた。また、ポリフェノールの抗IFV活性については、ポリフェノール同士の相乗効果が生じた可能性も考慮する必要がある。例えば、茶に含まれるカテキンにおいては、複数のカテキンが混合されたときに抗IFV活性が増強されたことが報告されている<sup>31</sup>。本研究で用いたナツハゼのIFV感染阻害活性は高く、この強力な抑制効果はフェルラ酸誘導体の効果だけではなく、相乗効果が影響をおよぼした可能性も考えられた。

一方、IFVには、A型、B型、C型が存在し、特にA型においてはノイラミニダーゼやヘマグルチニンといったウイルス表面に存在するタンパク質の組み合わせによって多くの亜型があり、さらに変異株が存在することからその種類は非常に多い。そこで本試験では5種類のベリー類果実の果汁を用い、型および株の異なる4種類のIFVに対する感染阻害活性を確認したところ、同じ果汁であってもIFVの型や株によって活性に強弱があることが確認された。特にクランベリーにはB型プロアントシアニジンが多いことが知られており、ブルーベリーやブラックカラントとはポリフェノールの組成が大きくことなっている<sup>32</sup>。これらのことから、IFVの型や株によって活性が異なる要因は、ヘマグルチニンやノイラミニダーゼ等、IFVの構造の違いによって差が生じたものと推察された。

また、ナツハゼを用いた果汁素材の加工方法について比較を行った結果、乾燥果実から熱水を用いて抽出した素材のIFV感染阻害活性が高かった。これはいわゆるお茶やハーブティーを淹れる場合と同じような条件であり、また、乾燥方法においては凍結乾燥を用いることによって特徴的な紫色をより有効に活用できることから、ナツハゼ果実はハーブティーのような利用法も適していることが示された。一方、飴に加工する際には150℃以上になるが、そのような高温条件下でもIFV感染阻害活性が保持された。食品加工においては焼成や殺菌などの加熱行程を経る場合が多く、加熱後も機能性を維持することは果実加工品の機能性を評価する上で重要な情報である。

ナツハゼ果実に着目すると、栽培されている地域が限られており、収穫も手作業であるため、食品企業が加工原料として用いるほどの収穫量の確保は難しく、コスト面でも高くなってしまふ。さらに、農作物としての栽培方法などは確立されておらず、ナツハゼ果実の利用拡大のためには課題が残されている。しかしながら、その野性味のある味や濃厚な紫色、そして本研究で明らかになったIFV感染阻害活性など、食品素材としては魅力的であり、活用の幅は広いと考えられる。ナツハゼ果実は収量性等の点

で不利な側面を持つが、逆にその特性を活かし、ブルーベリーとは違った立ち位置で、より地域に根差した特産果実として育てていくことによって、その魅力を伝えることができると思われる。

一方、ブルーベリーにおいては観光農園を中心に広く栽培され、様々な品種が栽培されている。本研究で得られた IFV 感染阻害活性は細胞レベルでの機能性であるため、その効能を謳うことはできないが、ブルーベリーの新たな機能性として、その味や香りとともに様々な品種を比較するための指標にすることで、ブルーベリーの魅力が増すのではないかと考えている。

今後は本研究で得られた成果を活用し、新たな付加価値を持った加工品の開発を行うことにより、県産果実の利用拡大や地域の活性化に貢献していきたいと考えている。

### 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました福島県立医科大学医学部微生物学講座 錫谷達夫教授、生田和史講師(現 東北医科薬科大学医学部微生物学教室准教授)、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門企画管理部 亀山眞由美部長(現 西日本農業研究センター企画部長)に深く感謝申し上げます。

また、本研究を遂行する上で多くのご指導、ご協力、ご激励を賜りました、福島県立医科大学医学部微生物学講座 石岡賢講師、腰塚哲朗講師(現 岐阜薬科大学薬学部薬科学科感染制御学准教授)、小林敬広助教、宮崎希助教、西山恭子専門医療技師、菅野良子主任医療技師に心から深くお礼申し上げます。

ブルーベリーおよびナツハゼ果実につきましては、会津若松氏北会津町「みのり農園」の故成田和彦氏、田村市都路町の渡辺ミヨ子氏に快くご提供して頂きました。ここに改めて深謝いたします。

そして、社会人課程での入学を許可して頂き、本研究の遂行にご支援いただきました福島県農業総合センターの皆様には深く感謝いたします。

### 引用文献

- 1) Kalt W, McDonald JE, Fillmore SA, Tremblay F. Blueberry effects on dark vision and recovery after photobleaching: placebo-controlled crossover studies. *J Agric Food Chem.* **46**:11180-11189(2014)
- 2) Liu Y, Song X, Zhang D, Zhou F, Wang D, Wei Y, Gao F, Xie L, Jia G, Wu W, Ji B. Blueberry anthocyanins: protection against ageing and light-induced damage in retinal pigment epithelial cells. *J Nutr.* **108**:16-27(2012)

- 3) Li J, Ruzhi Deng, Hua X, Zhang L, Lu F, Coursey TG, Pflugfelder SC, Li DQ. Blueberry Component Pterostilbene Protects Corneal Epithelial Cells from Inflammation via Anti-oxidative Pathway. *Sci Rep.* **6**:19408(2016)
- 4) Bingül İ, Başaran-Küçükgergin C, Aydın AF, Soluk-Tekkeşin M, Olgaç V, Doğru-Abbasoğlu S, Uysal M. Blueberry treatment attenuated cirrhotic and preneoplastic lesions and oxidative stress in the liver of diethylnitrosamine-treated rats. *Int J Immunopathol Pharmacol.* **29**:426-437(2016)
- 5) Braga PC, Antonacci R, Wang YY, Lattuada N, Dal Sasso M, Marabini L, Fibiani M, Lo Scalzo R. Comparative antioxidant activity of cultivated and wild Vaccinium species investigated by EPR, human neutrophil burst and COMET assay. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* **17**:1987-1999(2013)
- 6) Contreras RA, Köhler H, Pizarro M, Zúiga GE. In Vitro Cultivars of Vaccinium corymbosum L. (Ericaceae) are a Source of Antioxidant Phenolics. *Antioxidants (Basel).* **4**:281-292(2015)
- 7) Ikuta K, Mizuta K, Suzutani T, Anti-influenza virus activity of two extracts of the blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) from New Zealand and Poland. *Fukushima J Med Sci.* **59**:35-38(2013)
- 8) Joshi SS, Howell AB, D'Souza DH, Reduction of Enteric Viruses by Blueberry Juice and Blueberry Proanthocyanidins. *Food Environ Virol.* **8**:235-243(2016)
- 9) Suzutani T, Ogasawara M, Yoshida I, Azuma M and Knox YM, Anti-herpesvirus activity of an extract of *Ribes nigrum* L. *Phytother Res* **17**:609-613(2003)
- 10) Ikuta K, Hashimoto K, Kaneko H, Mori S, Ohashi K and Suzutani T, Anti-viral and anti-bacterial activities of an extract of the Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.). *Microbiol Immunol.* **56**:805-809(2012)
- 11) Knox YM, Suzutani T, Yoshida I and Azuma M, Anti-influenza virus activity of crude extract of *Ribes nigrum* L. *Phytother Res.* **17**:120-122(2003)
- 12) Knox YM, Hayashi K, Suzutani T, Ogasawara M, Yosida I, Shiina R, Tsukui A, Terahara N and Azuma M, Activity of anthocyanins from fruit extract of *Ribes nigrum* L. against influenza A and B viruses. *Acta Virol.* **45**:209-215(2001)
- 13) Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method Enzimol.* **299**:152-178(1999)
- 14) 関澤春仁, 山下慎司, 後藤裕子, 谷口彩, 高橋真紀子, 室井梨沙子, 河野圭助, 鈴木賢二, 地域特産資源を活用したふるさとブランド機能性食品の開発—県産果実(ベリー類)を利活用した機能性食品の開発—, 福島・山形・新潟三県共同研究事業研究報告書, 2-11(2009)
- 15) Oki T, Masuda M, Furuta S, Nihiba Y, Suda I. Radical scavenging activity of friend Chips made from purple-fleshed sweet potato. *Food Sci Technol Res.* **48**:926-932(2001)

- 16) Kammerer D, Carle R, Schieber A. Characterization of phenolic acids in black carrots (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **18**:1331-1340(2004)
- 17) Fang N, Yu S, Prior RL. LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums. *J. Agric Food Chem.* **50**:3579-3585(2002)
- 18) Vallverdú-Queralt A, Regueiro J, Martínez-Huélamo M, Rinaldi Alvarenga JF, Leal LN, Lamuela-Raventos RM. A comprehensive study on the phenolic profile of widely used culinary herbs and spices: rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chem.* **154**:299-307(2014)
- 19) Jabeur I, Martins N, Barros L, Calhelha RC, Vaz J, Achour L, Santos-Buelga C, Ferreira IC. Contribution of the phenolic composition to the antioxidant, anti-inflammatory and antitumor potential of *Equisetum giganteum* L. and *Tilia platyphyllos* Scop. *Food Funct.* **8**:975-984(2017)
- 20) Park S, Kim JI, Lee I, Lee S, Hwang MW, Bae JY, Heo J, Kim D, Han SZ, Park MS. Aronia melanocarpa and its components demonstrate antiviral activity against influenza viruses. *Biochem Biophys Res Commun.* **440**:14-19(2013)
- 21) Kinoshita E, Hayashi K, Katayama H, Hayashi T, Obata A. Anti-influenza virus effects of elderberry juice and its fractions. *Biosci Biotechnol Biochem.* **76**:1633-1638(2012)
- 22) Weiss EI, Houry-Haddad Y, Greenbaum E, Hochman N, Ofek I and Zakay-Rones Z, Cranberry juice constituents affect influenza virus adhesion and infectivity. *Antivir Res.* **66**:9-12(2005)
- 23) Nogchi A TT, Watanabe T, Yasui H, Inhibitory Effect of Cassis Extract against Influenza Virus Infection. *Journal of the Faculty of Agriculture SHINSHU UNIVERSITY.* **44**:1-8(2008)
- 24) Roschek B Jr, Fink RC, McMichael MD, Li D, Alberte RS. Elderberry flavonoids bind to and prevent H1N1 infection in vitro. *Phytochemistry.* **70**:1255-1261(2009)
- 25) Sekizawa H, Ikuta K, Mizuta K, Takechi S, Suzutani T. Relationship between polyphenol content and anti-influenza viral effects of berries. *J Sci Food Agric.* **93**:2239-2241(2013)
- 26) Sekizawa H, Ikuta K, Kameyama M, Suzutani T. Identification of the Components in a *Vaccinium oldhamii* Extract Showing Inhibitory Activity against Influenza Virus Adsorption. *Foods.* **8**(5):172(2019)
- 27) Hariono M, Abdullah N, Damodaran KV, Kamarulzaman EE, Mohamed N, Hassan SS, Shamsuddin S, Wahab HA. Potential New H1N1 Neuraminidase Inhibitors from Ferulic Acid and Vanillin: Molecular Modelling, Synthesis and in Vitro Assay. *Sci Rep.* 2016, **6**, 38692.
- 28) Yang ZF, Bai LP, Huang WB, Li XZ, Zhao SS, Zhong NS, Jiang ZH. Comparison of in vitro antiviral activity of tea polyphenols against influenza A and B viruses and structure-activity relationship analysis. *Fitoterapia.* **93**:47-53(2015)
- 29) Choi HJ, Song JH, Park KS, Kwon DH. Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. *Eur J Pharm Sci.* 2009, **37**, 329-333.
- 30) Derksen A, Hensel A, Hafezi W, Herrmann F, Schmidt TJ, Ehrhardt C, Ludwig S, Kühn J. 3-O-galloylated procyanidins from *Rumex acetosa* L. inhibit the attachment of influenza A virus. *PLoS One.* e110089(2014)
- 31) Song JM, Kwang HL, Seong BL. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antivir Res.* **68**:66-74(2005)
- 32) Wang CH, Fang CC, Chen NC, Liu SS, Yu PH, Wu TY, Lee CC, Chen SC. Cranberry-containing products for prevention of urinary tract infections in susceptible populations: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med.* **172**:988-996(2012)

### Summary

Herein, we report on the anti-influenza virus infection inhibitory activity of blueberries and related fruits. We investigated IFV infection inhibitory activity of 39 species of berry fruits using cultured cells. As a result, Elliot, which is a Northern High Bush blueberry, and rabbit eye blueberry varieties have high levels of IFV infection inhibitory activity. It was also revealed that wild blueberries, Natsuhaze (*Vaccinium oldhamii*) and Bilberry have very high activity. In addition, we confirmed that there was a good correlation between IFV inhibitory activity and total polyphenol content of the berries. Based on these results, we investigated the components involved in the infection inhibitory activity of the Natsuhaze berries. As a result of fractionation of the fruit extract of Natsuhaze using synthetic adsorption resin, fractions with ethanol concentrations of 30, 40, and 50% showed high levels of IFV infection inhibitory activity, and were found to contain polyphenols other than anthocyanin. Those fractions were then analyzed by HPLC, and three characteristic peaks were found. These peaks had IFV infection inhibitory activity and, when analyzed by ESI-LC/MS, these fractions were found to contain procyanidin B2 and ferulic acid derivatives, respectively. In addition, the IFV infection inhibitory activity of berry fruits was examined by against various IFV types, which revealed that the IFV infection inhibiting activity of the berry fruit is dependent on the virus type and strain. On the other hand, it was confirmed that the IFV infection inhibiting activity of Natsuhaze fruit is maintained even after heat treatment, and candy containing 1% dry Natsuhaze fruit powder has high IFV infection inhibitory activity. This study revealed that it is possible to develop processed products making use of the IFV infection inhibitory activity of blueberries and Natsuhaze fruit.

