

食用藍藻髮菜由来酸性多糖分子の構造と抗ウイルス活性

兼清健志,^a 林 京子,^a 李 貞範,^a 竹中裕行,^b 林 利光^{*,a}Structure and Antiviral Activity of an Acidic Polysaccharide from an Edible Blue-green Alga, *Nostoc flagelliforme*Kenji KANEKIYO,^a Kyoko HAYASHI,^a Jung-Bum LEE,^a
Hiroyuki TAKENAKA,^b and Toshimitsu HAYASHI^{*,a}^aGraduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences for Research, University of Toyama,
2630 Sugitani, Toyama City 930-0194, Japan and ^bMAC Gifu Research Institute,
4-15 Akebono-cho, Gifu City 500-8148, Japan

(Received December 12, 2007)

Recently, the development of antiviral agents with novel mechanisms of action has been required since many types of infectious disease have become a serious problem in our society. In the present study, we isolated a novel acidic polysaccharide, nostoflan (NSF), from a terrestrial blue-green alga, *Nostoc flagelliforme*, and examined its structure and antiviral activity. The sugar composition and methylation analyses of NSF revealed that it is mainly composed of (→4)-D-Glcp-(1→, →6,4)-D-Glcp-(1→, →4)-D-Galp-(1→, →4)-D-Xylp-(1→, D-GlcAp-(1→, D-Manp-(1→) with a ratio of ca. 1 : 1 : 1 : 1 : 0.8 : 0.2. Oligosaccharide analysis after partial acid hydrolysis of NSF revealed that this polysaccharide might be mainly composed of the sugar sequences of (→4)-β-D-Glcp-(1→4)-D-Xylp-(1 and →4)-[β-D-GlcAp-(1→6)-]-β-D-Glcp-(1→4)-D-Galp-(1→). NSF showed potent antiviral activities against several enveloped viruses including herpes simplex virus type 1, type 2 (HSV-1, HSV-2), human cytomegalovirus, and influenza A virus (IFV). NSF selectively inhibited the attachment of HSV-1 to host cells but not its penetration phase. In an experimental animal study where IFV-infected mice received NSF intranasally, the mortality of mice was significantly decreased. Neutralizing titers in sera of mice treated with NSF were higher than in those treated with oseltamivir. From these results, NSF was found to be a novel polysaccharide that shows antiviral activity *in vitro* and *in vivo* in spite of a nonsulfated polysaccharide.

Key words—*Nostoc flagelliforme*; polysaccharide; antiviral activity

1. はじめに

近年、糖鎖は、核酸、タンパク質に続く第3の生命鎖として注目されており、生体内における糖鎖の機能解明が進められている。一方、外来性の糖鎖を生体に与えてやると、その構造の違いに応じて細胞の働きを調節し、様々な生物活性を示すことが明らかになってきた。生体内の糖鎖の機能の解明と並行して、このような外来性の糖鎖関連分子の構造と機能の解明を進めることで、それらの作用を利用した新しい医薬品や食品の開発が期待される。

筆者らは、これまでにウイルス感染症に対する天

然物由来糖鎖の有用性を検討してきた。本総説では、中国やモンゴルなどの内陸の乾燥した砂漠地帯に生育する陸生藻である *Nostoc flagelliforme* から単離した抗ウイルス活性多糖 nostoflan の構造と抗ウイルス活性について概説する。*N. flagelliforme* は、中国では“髮菜”（ファーツァイ）と呼ばれている。その発音が財をなすと言う意味の“発財”に似ていることから、現地では古くから縁起物として珍重されており、薬膳にも利用されている。*N. flagelliforme* は、藍藻類ネンジュモ目に属し、それぞれの細胞は球状で、それが数珠（念珠）のようにつながった構造をしている。

本藍藻は、その微粉末を用いて医薬品毒性試験法ガイドラインに準じた急性毒性試験及び亜急性毒性試験が実施され、食用として安全であることが報告されているほか、熱水抽出物がマクロファージ活性

^a富山大学大学院医学薬学研究部（〒930-0194 富山市杉谷 2630）、^bMAC 総合研究所（〒500-8148 岐阜市曙町 4-15）

*e-mail: hayashi9@pha.u-toyama.ac.jp

本総説は、日本薬学会第127年会シンポジウムSD2で発表したものを中心に記述したものである。

化能を有することも報告されている。^{1,2)}

2. 髪菜から抗ウイルス活性物質の抽出・分離

髪菜からの抗ウイルス活性物質の分離・精製は、単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) に対する増殖阻害活性を指標にして行った。³⁾ 髪菜の乾燥藻体を熱時還流抽出し、得られたエキスに 4 倍量の EtOH を加えて可溶部と不溶部 (NP) に分画した。NP に比較的強い抗 HSV-1 活性が認められたのでこれを透析し、透析内液 (NPH) と透析外液 (NPL) に分画し、それぞれを凍結乾燥した。NPH に活性が認められたので、この画分をイオン交換カラムクロマトグラフィー (Toyopearl DEAE 650M) に付し、塩化ナトリウムの濃度勾配を 0 から 0.5M まで直線的に変化させて溶出を行い、260 nm における吸光度及びフェノール硫酸法⁴⁾により呈色させたのちの 480 nm における吸光度を測定して分画した。このようにして得られた主要な画分 (NPHM) を Sepharose 6B 及び Toyopearl HW-55F を用いて繰り返しゲルろ過を行ったところ、最終的に得られた画分 (NPHM2b-2B) に強力な抗 HSV-1 活性が認められた。NPHM2b-2B について HPLC (GFC)、及び、セルロースアセテート膜を用いた電気泳動により純度検定を行った結果、分子量的にも荷電的にも均一であることが確認されたので、これを nostoflan と命名した (Fig. 1)。

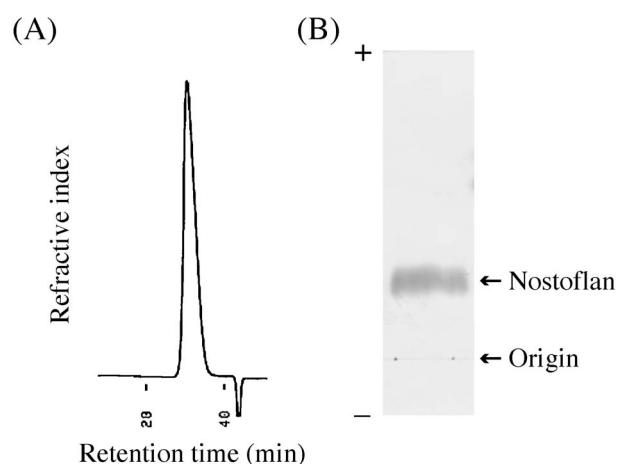


Fig. 1. HPLC Chromatogram (A) and Cellulose Acetate Membrane Electrophoretic Pattern (B) of Nostoflan

A: nostoflan was analyzed by TSKgel GMPW_{XL} column (7.6×300 mm ×2) with 0.2M NaCl at 30°C and flow rate of 0.5 ml/min. Refractive index detector was used. B: purified nostoflan (5 μg) was applied to a cellulose acetate membrane (SEPARAX, Jokoh, Japan) and run for 45 min at 0.5 mA/cm in a 0.1M pyridine-0.47M formic acid buffer (pH 3). Polysaccharide was stained with 0.25% toluidine blue.

3. Nostoflan の性状と糖鎖構造

単離された nostoflan は、エタノール不溶性の高分子で、フェノール-硫酸法による呈色反応は陽性、Bradford 法⁵⁾によるタンパク質の呈色反応は陰性であった。また、本物質は陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより吸着された画分から得られたことから、酸性多糖体であると考えられた。そこで、IR スペクトルを測定したところ、1250 cm⁻¹ 付近に S=O 伸縮振動による吸収が認められなかったこと、また、X 線マイクロアナライザーによる元素分析で硫黄が検出されなかったことから、nostoflan は硫酸基を持たない酸性多糖体であることが示唆された。

次に、本多糖体について、ゲルろ過法による見掛けの分子量を算出したところ 2.11×10⁵ という値を得た。また、比旋光度 [α]_D は +2.8° であった。Nostoflan の構成単糖を明らかにするため、完全加水分解後、生成物をアルジトールアセテート誘導体⁶⁾に導き、ガスクロマトグラフィーにより分析したところ、本多糖体には中性糖として主にグルコース、ガラクトース、キシロースのほか、少量のマンノースが含まれることが分かった。さらに、各構成単糖の絶対配置を明らかにするために nostoflan を加水分解後、チアゾリジン誘導体⁷⁾に導き、ついでこれをトリメチルシリル化して、ガスクロマトグラフィーにより分析した。⁶⁾ その結果、構成単糖はすべて D 体であることが分かった。また、*m*-ヒドロキシジフェニル法⁷⁾により nostoflan のウロン酸含有量を調べた結果、13.3% であることが明らかになった。そこで、nostoflan のウロン酸残基のカルボキシル基を還元したウロン酸還元化物について、同様に構成単糖を分析したところ、D-グルコースの含有量が顕著に増加したことから、含まれるウロン酸は D-グルクロン酸であることが分かった。

構成単糖の種類が分かったので、メチル化分析による構成糖の結合様式の解明を試みた。まず、中性糖残基の結合様式を明らかにするために nostoflan



兼清健志

1978 年山口県生まれ。富山医科薬科大学 (現 富山大学) 薬学部卒業。同博士前期課程・博士後期課程修了。2008 年 物理化学研究所研究員。

そのものを Anumula & Taylor 法⁸⁾に従ってメチル化後、加水分解し、部分メチル化アルジトールアセテート誘導体として GC 及び GC-MS で分析を行った。ついで、ウロン酸残基の結合様式を明らかにするために、nostoflan のウロン酸還元化物についても同様にメチル化分析を行った。その結果、中性糖としては主に 1,4-結合したグルコピラノース、ガラクトピラノース、キシロピラノース、及び 1,4,6-結合したグルコピラノースが約 1:1:1:1 の割合で存在し、少量のマンノピラノースは非還元末端位に結合していることが示唆された。また、ウロン酸還元化物のメチル化分析の結果を nostoflan の結果と比較すると、非還元末端位に結合したグルクロピラノースの存在が示唆された。

次に nostoflan の部分構造を明らかにするために、部分酸加水分解によりオリゴ糖を調製し、その解析を試みた。まず、nostoflan を 0.2N トリフルオロ酢酸 (TFA) を用いて、90°C で 3 h 部分酸加水分解した。生じたオリゴ糖を Dowex 1-X8 (酢酸型) に付し、蒸留水で溶出してくる中性糖画分 (OSN)、4M 酢酸及び 8M 酢酸で溶出してくる酸性糖画分 (OS4A 及び OS8A) に分画した。それぞれのオリゴ糖画分は 2-アミノピリジンで還元末端を蛍光標識した。得られたピリジルアミノ (PA) 化オリゴ糖はそれぞれゲルろ過 (Toyopearl HW-40F) に付し、235 nm における吸光度及びフェノール硫酸法による呈色反応後の 480 nm における吸光度を測定し、それぞれの溶出曲線を基に分画した。

比較的少量に得られた OSN-4 と OS4A-2 を COSMOSIL 5C18-AR-II カラムによりさらに分画し、PA 化オリゴ糖の 1 つであると考えられる OS-

N-4c2 及び OS4A-2e をそれぞれ単離した。各々について種々の NMR スペクトルを測定した。

OSN-4c2 の ^1H NMR スペクトルで、 $\delta 4.64$ ppm ($J=8.2$ Hz) にアノメリックプロトンに特徴的なシグナルが観測されたことから、OSN-4c2 は PA 化二糖で β 結合であることが分かり、 ^{13}C NMR で観測されたシグナル数とも一致した。一方、 ^1H - ^1H COSY スペクトルにより構成単糖単位の帰属を行ったのち、HMQC スペクトルにより各炭素の帰属を行い、さらに HMBC スペクトルを用いて炭素と水素間の遠隔スピン結合の特定を行った結果、OSN-4c2 は $\beta\text{-Glc}p\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-Xyl-PA}$ であることが明らかになった。

OS4A-2e についても同様に解析を行った。 ^1H NMR スペクトルで、アノメリックプロトンに特徴的な 2 つのシグナルが $\delta 4.57$ ppm ($J=8.1$ Hz) と $\delta 4.55$ ppm ($J=8.5$ Hz) に観測され、アノメリックはともに β 結合であることが分かった。また、 ^{13}C NMR で観測されたシグナル数からも OS4A-2e は PA 化三糖であることが分かった。次に、 ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC, TOCSY スペクトルにより同様に解析した結果、OSN-4c2 は $\beta\text{-Glc}Ap\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-Glc}p\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-Gal-PA}$ であることが判明した。以上の結果から、nostoflan は部分構造として少なくとも $\beta\text{-D-Glc}p\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-D-Xyl}p$ 及び $\beta\text{-D-Glc}Ap\text{-}(1\rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D-Glc}p\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-D-Gal}p$ のような糖鎖配列を含んでおり (Fig. 2)、一部の非還元末端位にはグルクロン酸の代わりにマンノースが結合していると考えられる。これはメチル化分析の結果ともほぼ一致する。

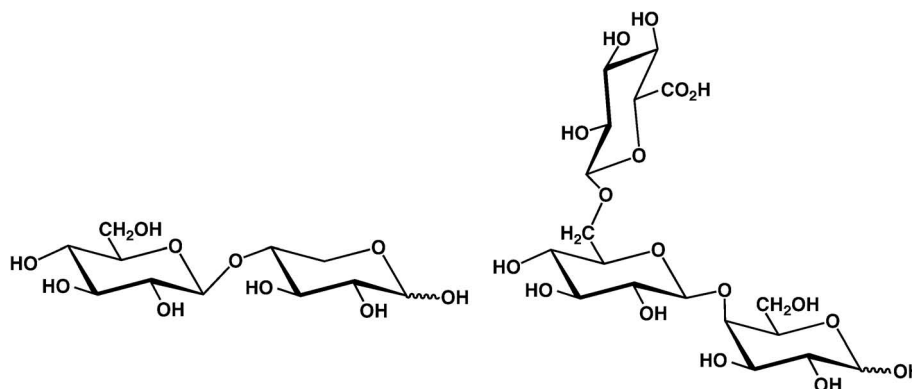


Fig. 2. Structures of Oligosaccharides

4. Nostoflan の抗ウイルス作用機序の解明

先述のように, nostoflan は HSV-1 増殖抑制効果を指標にして分離・精製された. そこで, nostoflan は HSV-1 に対してのみ特異的に増殖抑制効果を示すのかどうかを明らかにするため, 種々のウイルスに対する本物質の増殖抑制効果を調べた.³⁾ その結果, nostoflan は, エンベロープを有するウイルスである HSV-1, HSV-2, ヒトサイトメガロウイルス (HCMV), 及び A 型インフルエンザウイルス (IFV) に対しては, 強弱はあるものの, いずれも増殖阻害活性を示した. 一方, エンベロープを持たないウイルスであるアデノウイルスとコクサッキーウイルスに対しては, nostoflan の抗ウイルス効果は認められなかった. このことから, nostoflan は, ウイルスエンベロープと宿主細胞との相互作用を阻害することによって作用を発揮する広域スペクトルの抗ウイルス活性物質であると考えられる.

次に, nostoflan がウイルスの増殖のどの段階に効果を及ぼすのかを明らかにするために, HSV-1 を用いて, time-of-addition 実験を行った.⁹⁾ ウイルス感染中のみならず nostoflan が培地中に存在した場合及び, ウイルス感染中からその後 24 時間に渡って nostoflan が存在した場合に, ウイルスの増殖は濃

度依存的に阻害された. 一方, 宿主細胞を nostoflan で 3 時間前処理した場合や, ウイルス感染直後から, また, 感染処理以降に nostoflan を培地中に添加した場合には, ほとんど増殖阻害効果は認められなかった (Fig. 3). 以上のことから, nostoflan は, ウイルスが宿主細胞に吸着・侵入する段階を選択的に阻害していることが示唆された.

そこで, 吸着段階と侵入段階のいずれに nostoflan が影響を及ぼすのかを調べた. まず, 吸着段階における nostoflan の効果を検討した. 本実験では, 種々の濃度の nostoflan 存在下で Vero 細胞に HSV-1 を, 4°C, すなわちウイルスは宿主細胞に吸着はできるが侵入はできないという温度条件で感染させた. 1 時間後, 未吸着ウイルス粒子と余剰の nostoflan を洗浄除去し, 細胞懸濁液をプラークアッセイに供した. その結果, nostoflan は濃度依存的にウイルスの吸着を阻害した. 次に, 侵入段階における効果を検討した. Nostoflan 非存在下でウイルスを 4°C で 1 時間吸着処理し, その後, 種々の濃度の nostoflan を加えてすぐに 37°C で侵入を開始させた. 一定時間後 (0.5-6 時間後) に, 未侵入ウイルスを不活性化して, 侵入ウイルス量を測定した. その結果, いずれの nostoflan 濃度においても顕著な変化はみられなかったことから, nostoflan

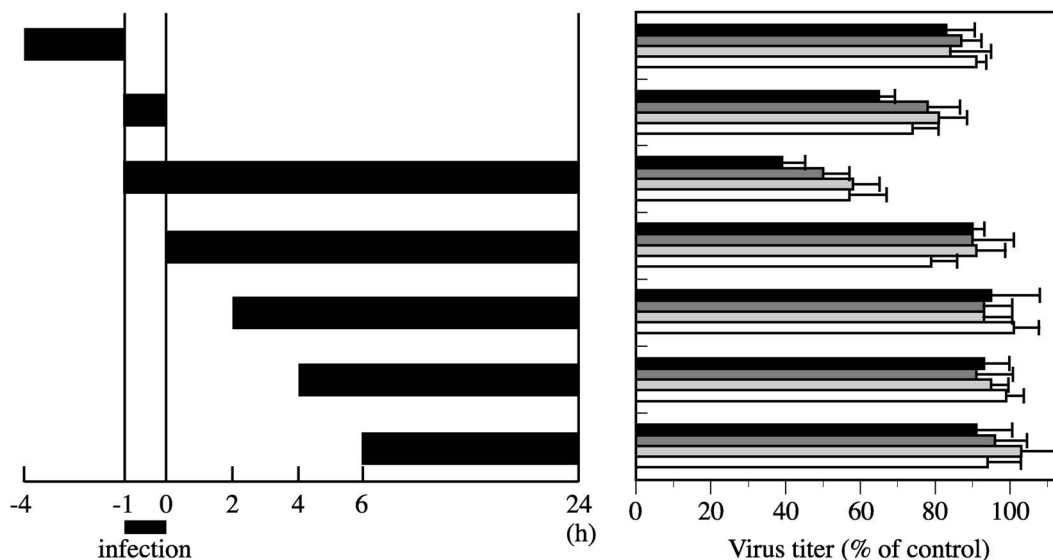


Fig. 3. Time-of-addition Experiments of Nostoflan

Anti-HSV-1 assay was carried out with Vero cells infected with a high titer of 10 PFU per cell. Nostoflan was added to the culture medium at indicated time as shown in left panel. After the incubation period, virus yields were plaque-assayed, and antiviral activities were expressed as percent of control. Sample concentrations were as follows: 100 µg/ml (Black bar), 10 µg/ml (Gray bar), 1 µg/ml (Stripe bar), 0.1 µg/ml (White bar). Data show means ± S.D. from triplicate experiments.

は侵入段階には影響しないことが分かった。以上の実験結果から、nostoflan はウイルスの吸着段階を選択的に阻害することが明らかになった。

藻類由来の多くの硫酸化多糖は、ウイルスの宿主細胞への吸着・侵入段階に作用し、その抗ウイルス活性には硫酸基の存在が必須であることが知られている。^{10,11)}しかし、前述のように、nostoflan は硫酸基を持たず、酸性基としてはカルボキシル基のみを含んでおり、nostoflan の抗ウイルス活性発現にカルボキシル基が寄与する可能性がある。そこで、nostoflan とウロン酸還元化物について HSV-1 に対する増殖阻害活性を比較したところ、nostoflan の抗ウイルス活性は、ウロン酸を還元することにより顕著に減少した。したがって、nostoflan の抗ウイルス作用発現にはウロン酸の存在が重要であることが分かった。

Nostoflan は、HSV-1 の宿主細胞への吸着を選択的に阻害することが分かったので、次に、抗 IFV 作用標的を調べるために同様に吸着阻害試験と侵入阻害試験を行った。吸着阻害試験の結果、HSV-1 に対してよりも効果は弱いものの、nostoflan は濃度依存的に IFV の吸着を阻害した。一方、侵入阻害試験において、いずれの nostoflan 濃度においても顕著な変化はみられなかったことから、nostoflan は IFV の侵入段階にも影響しないことが分かった。以上の実験結果から、nostoflan の抗 IFV 標的もウイルスの宿主細胞への吸着段階であることが明らかになった。

5. Nostoflan の *In vivo* でのインフルエンザ治療効果

Nostoflan は *in vitro* でウイルスの吸着段階を選択的に阻害することが分かったので、この点を生かすために、IFV 感染の場である鼻腔内に nostoflan をウイルス感染の直前に投与するという実験条件下で、本物質の効果を評価した。

致死量の IFV 感染後、コントロール群のマウスの体重は死亡に至るまで急激に減少した。Nostoflan 経鼻投与群では投与回数に係わらず、感染 7 日後まで一過性の体重減少が認められ、その後回復をたどった。Oseltamivir 経口投与群においても、nostoflan 投与群と同様の体重変化が認められた。蒸留水を経口投与したコントロール群では、すべてのマウスが感染 8 日後までに死亡し、PBS 経

鼻投与群も 9 日目までに全例死亡した。Nostoflan 投与群においては、コントロール群に比べてやや早期に死亡したマウスもいたが、死亡率は nostoflan 1 回、2 回、3 回投与群でそれぞれ 40%、60%、10% であった。Oseltamivir 経口投与群においてはかなりの体重減少があったにも係わらず、感染後の 14 日間で死亡例は認められなかった。以上のように、nostoflan 単独投与によって、IFV 感染マウスの体重減少を軽減し、死亡率を低下させることが明らかになった。また、nostoflan がウイルスの吸着段階を選択的に阻害することは先に述べた。抗 IFV 薬 oseltamivir は子孫ウイルスの放出に係わるノイラミニダーゼを阻害する薬剤である。したがって、この nostoflan と oseltamivir の作用標的は異なるので、両者を併用することによって相乗作用が期待できる。その点を確認するため、oseltamivir と nostoflan の併用効果を検討した。まず最初に、*in vitro* で種々の濃度の nostoflan と oseltamivir を組み合わせたときの抗 IFV 活性を評価した。各組み合わせから得られた IC₅₀ 値に基づいて、作成したアイソボログラムを作成した (Fig. 4)。この図では、相加作用は点線で示され、相乗作用はこの線より左方への移動で表される。実際に得られたデータから判断すると、nostoflan と oseltamivir に相乗効果のあることが明らかになった。

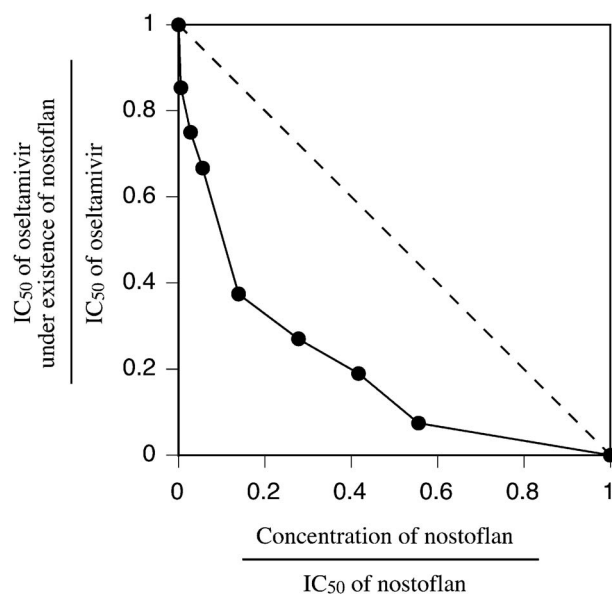


Fig. 4. Synergetic Effect of Nostoflan and Oseltamivir on IFV Replication in *In vitro*

次に、培養細胞感染系で確認された nostoflan による oseltamivir の抗 IFV 作用増強効果が、生体においても認められるかどうかを検討した。この際に、nostoflan の場合には 1 回量 0.2 mg 及び 0.5 mg、また、oseltamivir の場合には 1 日量 0.02 mg、0.05 mg 及び 0.2 mg とした。これまでの報告例では、BALB/c マウスを用いた IFV 感染モデルにおいて oseltamivir 0.2 mg/day/mouse という用量が有効量とされていることが多いため、本実験では最高用量とした。感染 3 日後の肺のウイルス量を測定したところ、いずれの薬物も投与していないコントロール群に比べて、oseltamivir のみを 1 日 0.02 mg 投与した群では有意差は認められなかった。ところが、この用量の oseltamivir に、0.2 mg の nostoflan を併用すると、コントロール群だけでなく、oseltamivir 単独投与群に比べても有意に肺のウイルス量が減少した。全体的に、各用量の oseltamivir に nostoflan を組み合わせることによって、oseltamivir 単独の場合よりも、有意のウイルス増殖抑制効果がみられた (Fig. 5)。

また、感染 3 日後の気管・気管支洗浄液 (BALF) 中のウイルス量を測定することにより、両物質の併

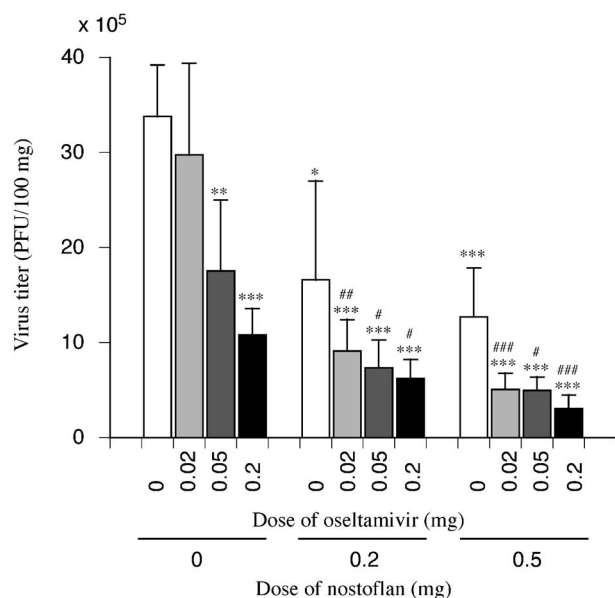


Fig. 5. Effect of a Combination of Nostoflan and Oseltamivir on Virus Production in the Lung of Mice

Virus titers in the lung were estimated at day 3 postinfection. Significant levels were determined using Student's *t*-test versus control groups: **p*<0.05, ***p*<0.005, ****p*<0.001. Significant levels were determined using Student's *t*-test versus oseltamivir-treated groups: †*p*<0.05, ††*p*<0.005, †††*p*<0.001.

用効果を評価した。この場合も、肺のウイルス量と同様の傾向が得られた。すなわち、コントロール群に対して、1 日量 0.02 mg の oseltamivir を単独投与した群では有意差は認められなかった。それに対して、1 回量 0.2 mg の nostoflan を併用した場合、0.02 mg の oseltamivir 投与群でも有意に肺のウイルス量が減少した。0.5 mg の nostoflan を併用した場合はさらに顕著な効果が認められた。

以上の結果から、nostoflan を併用することによって、単独では無効量の oseltamivir であっても、IFV の増殖を抑制できることが明らかになった。これは、互いに作用標的の異なる nostoflan と oseltamivir が相乗的に作用していることを示していると考えられる。このような薬剤併用治療を適用すれば、oseltamivir の低濃度での使用が可能になり、結果的に耐性ウイルスの出現や副作用などのリスクを回避できる可能性のあることが示唆された。

6. 総括

筆者らは、陸生藍藻 *N. flagelliforme* から新規の抗ウイルス活性多糖 nostoflan を単離した。メチル化分析の結果と部分加水分解産物の NMR スペクトル解析の結果から、本多糖体は、主として β -D-Glcp-(1→4)-D-Xylp 及び β -D-GlcAp-(1→6)- β -D-Glcp-(1→4)-D-Galp の構造からなっていることが推察されたが、糖鎖の繰り返し単位など詳細な構造に関してはさらなる検討が必要である。これまで、合成デキストラン硫酸や、フカン硫酸、ラムナン硫酸などの藻類由来硫酸化多糖が抗ウイルス作用を示すことが報告されているが、¹⁰⁻¹²⁾ これらの抗ウイルス作用発現には硫酸基などのポリアニオンの存在が必須であると考えられている。今回、髪菜から単離した nostoflan には硫酸基が存在せず、酸性基としてはカルボキシル基のみであり、このようなウロン酸を含む多糖が強力な抗ウイルス活性を有することが確認されたのは初めてである。一般的に硫酸化多糖を含む藻類は熱水エキスの段階で既に強力なウイルス増殖阻害作用を示すことが多いが、髪菜の場合は熱水エキスの段階ではウイルス増殖阻害作用が比較的弱く、分離・精製を進めるにつれて作用が著しく強くなった。なお、本多糖体のウロン酸が活性発現に寄与していることは、ウロン酸還元化合物では抗ウイルス活性が顕著に減退したことから推察できるが、抗ウイルス作用発現に関与する糖鎖構造の

詳細については今後の課題である。一方、nostoflanの抗ウイルス作用標的は、time-of-addition実験の結果から、主としてウイルスの宿主細胞への吸着・侵入段階であることが示唆され、吸着阻害試験及び侵入阻害試験の結果から、吸着段階を選択的に阻害することが明らかになった。さらに、本多糖体の抗ウイルス活性は、HSV-1に対してだけではなく、エンベロープを有するウイルス(HSV-2, HCMV, IFV)に対しても認められた。そこで、最近特に緊急の感染症対策が求められているIFVに着目して、詳細なnostoflanの有効性の評価を行った。幸いなことに、IFVの一部の株は、培養細胞を用いる*in vitro*実験だけでなく、マウス感染実験にも使用できることが分かっている。本研究で用いたNWS株は、そのうちの代表的な株の1つであり、これまでに抗IFV活性試験に広く適用されている。Nostoflanは、HSV-1の場合と同様に、IFVの宿主細胞への吸着を選択的に干渉することが明らかになった。このようなnostoflanの作用特性を生かすために、動物感染実験に際しては、経鼻接種したIFVの主たる増殖の場である鼻腔粘膜に本物質が存在し、ウイルスの粘膜細胞への吸着を阻止できる条件を設定した。このようにして実施した感染実験の結果、nostoflan単独投与のときには、感染マウスの体重減少や死亡率、ウイルス産生を抑制した。さらに単独投与でほとんど無効であった投与量のoseltamivirとの併用実験によって、nostoflanは、顕著なウイルス増殖阻害効果をもたらした。その作用増強効果は、*in vitro*でのnostoflanとoseltamivirの併用実験からも裏付けられた。このような相乗効果は、oseltamivirの単独投与による耐性ウイルス出現のリスクを軽減するだけでなく、投与量の低減に伴って副作用の発現率も下げることができると考え

られる。以上のことから、nostoflanは、新規の抗ウイルス薬としての有用性が期待される。

REFERENCES

- 1) Takenaka H., Yamaguchi Y., Sakaki S., Watarai K., Tanaka N., Hori M., Seki H., Tsuchida M., Yamada A., Nishimori T., Morinaga T., *Food Chem. Toxicol.*, **36**, 1073-1077 (1998).
- 2) Takenaka H., Sumiya T., Ito H., *Med. Biol.*, **135**, 231-234 (1997).
- 3) Kanekiyo K., Lee J.-B., Hayashi K., Takenaka H., Hayakawa Y., Endo S., Hayashi T., *J. Nat. Prod.*, **68**, 1037-1041 (2005).
- 4) Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Robers P. A., Smith F., *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956).
- 5) Bradford M., *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
- 6) Hara S., Okabe H., Mihashi K., *Chem. Pharm. Bull.*, **35** (2), 501-506 (1987).
- 7) Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G., *Anal. Biochem.*, **54**, 484-489 (1973).
- 8) Anumula K. R., Taylor P. B., *Anal. Biochem.*, **203**, 101-108 (1992).
- 9) Kanekiyo K., Hayashi K., Takenaka H., Lee J.-B., Hayashi T., *Biol. Pharm. Bull.*, **30** (8), 1573-1575 (2007).
- 10) Hayashi T., Hayashi K., Maeda M., Kojima I., *J. Nat. Prod.*, **59**, 83-87 (1996).
- 11) Hoshino T., Hayashi T., Hayashi K., Hamada J., Lee J.-B., Sankawa U., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 730-734 (1998).
- 12) Lee J.-B., Hayashi K., Hayashi T., Sankawa U., Maeda M., *Planta Med.*, **65** (5), 439-441 (1999).