

【原 著】

## クマザサ含有成分によるヒトサイトメガロウイルスの増殖抑制効果

### Anti-Human Cytomegalovirus Activity of Chemical Constituents from Kumazasa Hot Water Extract

阿久澤和彦<sup>1</sup>, 山田理恵<sup>1,\*</sup>, 畢 長暁<sup>1</sup>, 定成秀貴<sup>1</sup>, 松原京子<sup>1</sup>, 土田裕三<sup>2</sup>,  
渡邊邦友<sup>3</sup>, ニノ宮真之<sup>4</sup>, 瀨瀬 守<sup>4</sup>, 村山次哉<sup>1</sup>  
Kazuhiko AKUZAWA<sup>1</sup>, Rie YAMADA<sup>1,\*</sup>, Changxiao BI<sup>1</sup>, Hidetaka SADANARI<sup>1</sup>,  
Keiko MATSUBARA<sup>1</sup>, Yuuzou TSUCHIDA<sup>2</sup>, Kunitomo WATANABE<sup>3</sup>,  
Masayuki NINOMIYA<sup>4</sup>, Mamoru KOKETSU<sup>4</sup>, Tsugiya MURAYAMA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 北陸大学薬学部生体防御薬学教室

<sup>2</sup> 株式会社鳳凰堂

<sup>3</sup> 岐阜大学生命科学総合研究支援センター

<sup>4</sup> 岐阜大学工学部機能材料工学科材料創成工学講座

#### 【要 旨】

現在我々は、代替医療薬を中心に抗 HCMV 薬の探索を行っており、防腐作用（抗菌作用）を含む種々の生理活性をもつクマザサに着目し、その熱水抽出液に抗 HCMV 作用があることを明らかにしてきた。今回、クマザサ熱水抽出液の成分の一部が分離・精製・同定され、その中の1つである tricin がウイルス粒子産生に最も高い抑制効果を示すことがわかった。また、その抑制効果は、クマザサ抽出液同様のウイルス感染後の処理だけでなく、感染前処理した場合にも見られることがわかった。さらにリアルタイム RT-PCR 法および、ウエスタンブロット法による解析の結果、tricin がウイルスの複製・増殖に重要な major immediate early (IE) 遺伝子の発現を抑制することがわかり、tricin が現在使用されている GCV とは異なる作用機序により抗 HCMV 効果をもつことが示され、新たな治療薬としての可能性が示唆された。

#### 【キーワード】

ヒトサイトメガロウイルス、クマザサ、抗ウイルス活性

#### はじめに

ヒトサイトメガロウイルス (human cytomegalovirus: HCMV) は、ヘルペスウイルス科  $\beta$  亜科に属するヒトを宿主とするウイルスである。8~9 割のヒトが幼少期に感染後、通常は不顕性感染として経過し、生涯、排除されることなく体の中に潜伏感染している。しかしながら、後天性免疫不全症候群 (AIDS) の患者や臓器移植患者など免疫状態の低下した宿主（易感染性宿主）において、潜伏したウイルスが再活性化し、間質性肺炎、網膜炎、脳炎、大腸炎などの重篤な日和見感染症を引き起こし、失明や死亡の原因となる<sup>1-3</sup>。HCMV 感染症に対する治療薬として、現在わが国ではガンシクロビル (ganciclovir: GCV) とホスカルネット (foscarnet: PFA) が使用されているが、易感染性宿主における治療では、これらの薬物の長期間にわたる投与が必要であるため、薬物耐性 HCMV

受理日: 2009年7月23日

\* 〒920-1181 石川県金沢市金川町ホ-3番地 北陸大学薬学部生体防御薬学教室 Tel: 076-229-1165 Fax: 076-229-2781

E-mail: r-yamada@hokuriku-u.ac.jp

の出現が臨床的に重要な課題となっている<sup>4)</sup>。このため、作用機序の異なる新たな治療薬が期待されている<sup>5,6)</sup>。

植物からの抽出成分は種々の生物活性をもつことが知られており、これまでに多くの成分が抽出・分離・精製され医薬品として使用されている。このため、当研究室では、防腐作用（抗菌作用）<sup>7,8)</sup>を含む種々の生理活性をもち、古くから民間で利用されてきたクマザサに着目して、その熱水抽出液に抗 HCMV 作用があることを明らかにし、その作用は GCV や PFA とは異なるものであることを報告してきた<sup>9,10)</sup>。しかし、クマザサの熱水抽出液は粗抽出液であるため、どのような成分に抗ウイルス活性があるのか不明であった。

今回、クマザサ熱水抽出液の成分の一部が分離・精製され、構造決定された。得られた化合物について抗 HCMV 活性があるか検討したので報告する。

## 実験材料および実験方法

### 1. 細胞およびウイルス

HCMV 感染に用いた細胞は、ヒト胎児肺由来の二倍体線維芽細胞 (HEL) で<sup>11)</sup>、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に 10% fetal bovine serum, 0.6 mg/ml L-glutamine, 50 µg/ml Kanamycin を添加した培地 (DMEM 培地) にて継代培養 (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) したものをを用いた。ウイルスは、HCMV 標準株として実験室継代株の Towne 株<sup>12)</sup> を用い、HEL 細胞で増殖させた後、感染価をプラークアッセイ法<sup>13)</sup> により求め、液体窒素中に保存し用時溶解し使用した。

### 2. クマザサ熱水抽出液中の成分の分離精製

検体としたクマザサはクマイザサ *Sasa senanensis* (Franchet et Savatier) Rehder var. (*senanensis*) であり、北海道で7月末から8月末に採集した葉の乾燥したものを原料として、循環多段式加圧抽出法 (特許第32112278号) により (株) 鳳凰堂において製造されたクマザサ抽出液を使用した。

このクマザサ抽出液 1.43 Kg を原料として、図 2 に示すように酢酸エチル/ブタノールで分配処理をした。得られた酢酸エチル層を各種クロマトグラフィーにより分離・精製を繰り返して、Compound 1-5 を単離した。用いたシリカゲルクロマトグラフィー用カラムは SANSYO 社製で、シリカゲル 60 (関東化学) を充填して用いた。また、カラムのサイズは Compound 1 の分離精製には 60×500 mm の製品を、その他の分離精製には 20×30 mm の製品を用いた。

### Compound 1 の分離精製

クマザサ抽出液を酢酸エチル、ブタノールで順次分画し、得られた酢酸エチル画分 (52.0 g) をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、*n*-ヘキサン/酢酸エチル溶媒及びメタノールで溶出 (*n*-ヘキサン:酢酸エチル=1:1→2:3→3:7→1:4→メタノール) し、7画分を得た (Fr. A-Fr. G)。この中の画分 C (3.16 g)、及び F (1.5 g) を更に分離精製した。

画分 C の Solid phase をクロロホルム/アセトンで再結晶し、Compound 1 (478 mg) を得た。

### Compound 2 の分離精製

画分 C の水層 (2.2 g) をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、クロロホルム/アセトン溶媒 (クロロホルム:アセトン=20:1→7:3→3:2→0:1) で溶出し、Rf 値の同じ C1-C5 の5つの画分を得た。C1画分 (110 mg) を HPLC により (HPLC の条件; カラム: Wakosil-II 5C18HG prep, φ20.0×250 mm, 移動層: アセトニトリル: 蒸留水=2/8, 流速: 5 ml/min, カラム温度: 40°C, 検出: UV 260 nm) 精製をおこない Compound 2 (60 mg) を得た。

### Compound 3 の分離精製

C3画分 (152 mg) をシリカゲルクロマトグラフィーに付した後、クロロホルム/アセトン溶媒 (クロロホルム:アセトン=1:0→19:1→9:1→4:1→7:3→0:1→メタノール) で溶出した。1 mm 厚の薄層クロマトグラフィー (MERCK 製 20×20 cm, シリカゲル 60, F<sub>254</sub>) を用い、クロロホルム/アセトン溶媒 (3:7) で分離精製し、Compound 3 (86 mg) を得た。

### Compound 4 の分離精製

F画分 (1.5 g) をクロロホルムで抽出した。クロロホルム可溶性画分から脱水、乾燥後、カラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム溶媒 (クロロホルム:アセトン=10:1→4:1→1:1→3:7→0:1→メタノール) で溶出、Compound 4 (46 mg) を得た。

### Compound 5 の分離精製

F画分のクロロホルム抽出したものを、自然に再結晶し、得られた黄色の針状結晶を、Compound 5 (10 mg) とした。

これら5種類の化合物のスペクトルデータを下記に示す。

### Compound 1

Mp: 213°C. IR (KBr): 3168, 2803, 975 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ6.28 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 6.81 (d, *J*=8.6 Hz, 2H), 7.45 (d, *J*=8.6 Hz, 2H), 7.61 (d, *J*=16.0 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ115.6, 116.8, 127.2, 131.1, 146.7, 161.1, 171.0. MS (CI): *m/z* 164.

## Compound 2

Mp: 114–115 °C. IR (KBr) : 3179, 1668  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$ 3.91 (s, 3H), 6.94 (d,  $J=8.6$  Hz, 1H), 7.42 (d,  $J=8.6$  Hz, 1H), 7.43 (s, 1H), 9.74 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$ 56.3, 112.2, 116.3, 127.9, 130.6, 149.6, 154.6, 192.8.

## Compound 3

Mp: 118–119 °C. IR (KBr) : 3168, 1670  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$ 6.92 (d,  $J=8.4$  Hz, 2H), 7.77 (d,  $J=8.4$  Hz, 2H), 9.76 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$ 116.8, 130.2, 133.4, 165.1, 192.8.

## Compound 4

Mp: 127–128 °C. IR (KBr) : 3449, 1670  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$ 7.21–7.28 (m, 2H), 7.99 (dd,  $J=4.0, 1.7$  Hz, 1H), 8.09 (d,  $J=2.3$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$ 124.4, 125.9, 138.3, 140.8, 155.9.

## Compound 5

Mp: 260–261 °C. IR (KBr) : 3357, 1615  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $[\text{CD}_3]_2\text{CO}$ ) :  $\delta$ 3.97 (s, 6H), 6.26 (d,  $J=2.3$  Hz, 1H), 6.56 (d,  $J=2.3$  Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 7.39 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $[\text{CD}_3]_2\text{CO}$ ) :  $\delta$ 56.9, 94.9, 99.7, 104.7, 105.2, 105.4, 122.4, 140.9, 149.1, 158.8, 163.4, 164.9, 165.1, 183.1. MS (EI) :  $m/z$  330.

以上 5 種類の化合物の抗 HCMV 効果について検討した。

### 3. 分離精製された 5 種類の化合物の、ウイルス増殖に対する影響

化合物はあらかじめ DMSO で 3 倍希釈系列を作成し、1 ml DMEM 培地に 100  $\mu\text{l}$  添加したときの最終濃度が 33.3, 11.1, 3.6, 1.2, 0.4  $\mu\text{M}$  になるように調製した。単層培養した HEL 細胞に、HCMV 溶液を multiplicity of infection (MOI)=1 で、37°C 1 時間吸着感染した後、未吸着のウイルスを除き PBS buffer で細胞を洗った。その後 3 倍に希釈した化合物を含む DMEM 培地（最終濃度 33.3, 11.1, 3.6, 1.2, 0.4  $\mu\text{M}$ ）で 7 日間培養した。この時の培養上清を回収し、プラークアッセイ法を行い、培養上清中に放出された感染性ウイルス粒子の量を測定し、HCMV の複製に対する影響について調べた。得られた値は、平均値  $\pm$  標準偏差で表記した。薬理統計学的有意差は、Student の  $t$ -検定法で処理し、5%未満の危険率をもって有意差があると判定した。

### 4. Compound 5 (tricin) の、添加時間の違いによるウイルス増殖に対する影響

HCMV の増殖抑制効果の最も高かった Compound 5

(tricin) が、ウイルス感染のどの段階に作用しているのかを調べるため、tricin による処理タイミングを変えて検討した。すなわち、(1) tricin（最終濃度 0.4  $\mu\text{M}$ ）を含む DMEM 培地で 1 時間培養した後、DMEM 培地を除き、HCMV 溶液を MOI=1 で 37°C 1 時間吸着感染させる (tricin 前処理)、(2) HCMV 溶液を MOI=1 で、37°C 1 時間吸着感染した後ウイルスを除き、直ちに tricin（最終濃度 0.4  $\mu\text{M}$ ）を含む DMEM 培地で培養した（ウイルス感染 1 時間後処理）、(3) 同様に、HCMV 溶液を MOI=1 で、37°C 1 時間吸着感染した後ウイルスを除き、2 時間 DMEM 培地で培養した後、すなわちウイルス感染から 3 時間後に tricin（最終濃度 0.4  $\mu\text{M}$ ）を含む DMEM 培地に交換して培養したもの（ウイルス感染 3 時間後処理）、またウイルス感染から 8 時間後 tricin（最終濃度 0.4  $\mu\text{M}$ ）を含む DMEM 培地に交換して培養したもの（ウイルス感染 8 時間後処理）とした。これらを 6 日間培養し、培養上清中に放出される感染性ウイルスの量をプラークアッセイ法により測定し、tricin 添加時間の違いによる HCMV の増殖に対する影響について調べた。

### 5. Tricin 前処理による HCMV 増殖に対する影響

HEL 細胞に tricin を含む DMEM 培地 (tricin 最終濃度 3.6, 1.2, 0.4, 0.14, 0.046  $\mu\text{M}$ ) を加え 1 時間培養後、tricin 含有培地を除去し、HCMV を MOI=1 で 1 時間感染させた。この培養上清を、別に単層培養した HEL 細胞に感染させ、培養上清中の感染性ウイルスの量をプラークアッセイ法により測定した。

### 6. Tricin による HCMV に対する直接作用

Tricin を含む DMEM 培地 (tricin 最終濃度 1.2, 0.4, 0.14  $\mu\text{M}$ ) と、最終濃度で MOI=1 になるように調製した HCMV 溶液を混合し、37°C で 1 時間または 5 時間処理した。この培養液を単層培養した HEL 細胞に感染させ、感染性ウイルスの量をプラークアッセイ法により測定し、tricin によるウイルス粒子に対する直接作用がないか調べた。

### 7. ウェスタンブロット解析

HEL 細胞に、tricin を含む DMEM 培地 (tricin 最終濃度 0.4, 0.14, 0.046  $\mu\text{M}$ ) を加え 1 時間前処理を行った。Tricin 含有培地を除去し、HCMV を MOI=1 で感染させた。HCMV 感染細胞から培養液を除去後、DMEM 培地に変え 1, 3, 6 日間培養した。培養後の感染細胞は、SDS-sample buffer [2% sodium dodecyl sulfate, 5% 2-mercaptoethanol, 62.5 mM Tris-buffered saline (pH 6.8), 20% glycerol, 0.01% blomphenol blue] で溶解し回収した。RC

DC protein assay kit (Bio-Rad) を用いて細胞溶解液中の蛋白質の量を測定し、ウエスタンブロット解析<sup>14)</sup>用の試料とした。一定量の蛋白質を、10% SDS-polyacrylamide gel 電気泳動法により分離後、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。一次抗体として HCMV の主要前初期 (Major immediate early: IE) 蛋白質を認識するマウスモノクローナル抗体 Mab810 (Chemicon Inter. Inc.)、または HCMV の感染後期 (late) に発現する 65 kDa の蛋白質を認識するマウスモノクローナル抗体 0896 (ViroStat Inc.) を用い、二次抗体としてホースラディッシュパーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Bio-Rad) を用いた。また、HCMV 感染細胞にも未感染細胞にも一定量発現している蛋白質として  $\beta$ -アクチン (Chemicon Inter. Inc.) を用いた。目的蛋白質は ECL detection system (GE Healthcare Bio-sciences) により蛍光シグナルとして検出した。

#### 8. リアルタイム PCR 法による、tricin の主要前初期遺伝子 IE 及び DNA polymerase 遺伝子 (UL54) に対する抑制効果の検討

HEL 細胞に、tricin を含む DMEM 培地 (tricin 最終濃度 0.4, 0.14, 0.046  $\mu$ M) を加え 1 時間前処理を行った。Tricin 含有培地を除去し、HCMV を MOI=1 で感染させた。HCMV 感染細胞から培養液を除去後、DMEM 培地を添加し、3 または 6 日間培養した。ISOGEN (Nippon Gene) のプロトコルに従い、total RNA を抽出し、diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水に溶解した。RNase Inhibitor (Toyobo) を添加した DNase (RNase free, Nippon Gene) で 37°C、24 時間処理後、DEPC 処理水に溶解した。得られた total RNA の濃度を定量し、その一定量を iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) を用いて逆転写反応を行い、cDNA の合成を行った。合成した cDNA の一定量を鋳型として、IE2 遺伝子及びウイルスの UL54 遺伝子 (DNA polymerase 遺伝子) の発現量を、iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) を用いたリアルタイム PCR 法により定量した (表 1 に、本実験で使用したプライマーの配列を示す)。得られた IE2 遺伝子及び UL54 遺伝子の発現量

は、細胞の  $\beta$ -アクチンの発現量で標準化し、tricin 未処理の場合の相対比を 1 として比較した<sup>18,19)</sup>。

## 結果

### 1. 分離精製された 5 種類の化合物のウイルス増殖に対する影響

通常、HCMV 増殖許容性の線維芽細胞を用いて HCMV の増殖を調べた場合、ウイルス感染後 2 日目頃よりウイルス粒子の産生が観察され、7 日目頃にピークを迎えることが知られている。このため、HCMV 感染後に 5 種類の化合物 (図 1) を加えた培地で培養し、7 日目の培養上清中に産生される感染性ウイルス粒子数をプラークアッセイ法により定量した (図 3)。この結果、化合物非添加の場合に比べ、これらの化合物を添加することにより、濃度依存的なウイルス粒子産生の抑制がみられた。また、その抑制効果は特に Compound 5 (tricin) に強くみられた。このため、以後の実験には tricin を用いて抗ウイルス活性を検討した。

### 2. Tricin の添加時間を変えた場合のウイルス増殖に対する影響

Tricin がウイルス感染のどの段階に作用しているのかを調べるため、HEL 細胞への処理時間を変えて検討した

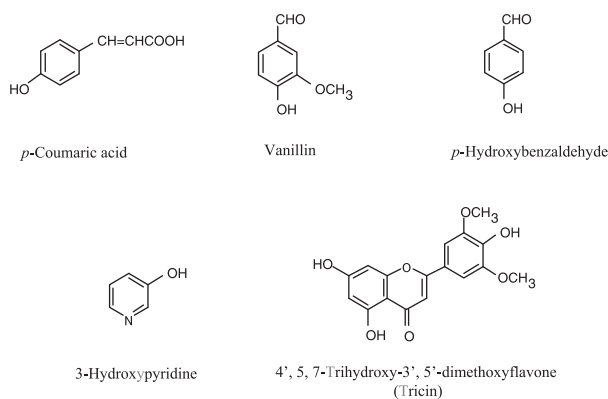


図 1 クマザサ抽出液から分離・精製し、構造決定した化合物

表 1 リアルタイム PCR 法に用いたプライマー配列

プライマー名	配列	参考文献
IE2 for.	5'-ATG AAC CAC CCT CCT CTT CC-3'	15
IE2 rev.	5'-GAT ATT GCG CAC CTT CTC GT-5'	15
UL54 for.	5'-TTG CGG GTT CGG TGG TTA-3'	16
UL54 rev.	5'-CGG CCA TAG TGT TGA GCT TAT AGT T-5'	16
Actin for.	5'-ATC ATG TTT GAG ACC TTC AAC-3'	17
Actin rev.	5'-CAG GAA GGA AGG CTG GAA GAG-5'	17

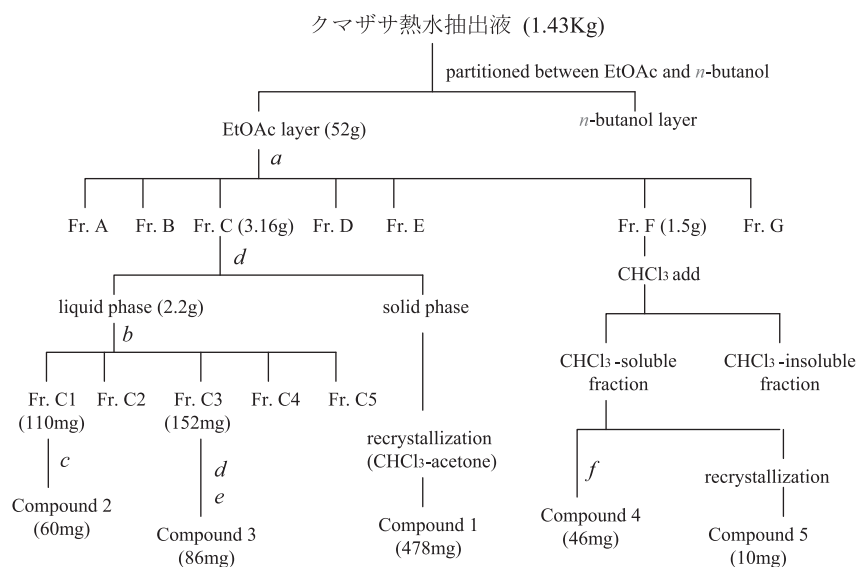


図2 クマザサ抽出液中の成分の分離・精製法

Column chromatography Condition.

*a*: SiO<sub>2</sub> column [*n*-hexane-EtOAc] (1 : 1→2 : 3→3 : 7→1 : 4→MeOH), *b*: SiO<sub>2</sub> column [CHCl<sub>3</sub>-acetone] (20 : 1→7 : 3→3 : 2→0 : 1), *c*: HPLC column [acetonitrile-dH<sub>2</sub>O] (2 : 8), *d*: SiO<sub>2</sub> column [CHCl<sub>3</sub>-acetone] (1 : 0→19 : 1→9 : 1→4 : 1→7 : 3→0 : 1→MeOH), *e*: PTLC [CHCl<sub>3</sub>-acetone] (3 : 7), *f*: SiO<sub>2</sub> column [CHCl<sub>3</sub>-acetone] (10 : 1→4 : 1→1 : 1→3 : 7→0 : 1→MeOH)

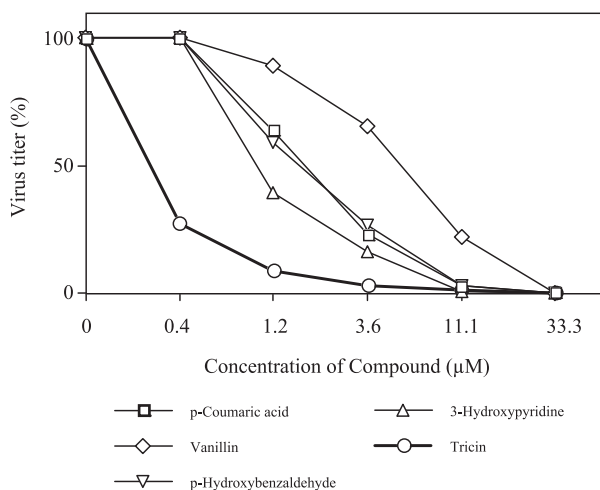


図3 クマザサ抽出液の成分による HCMV に対する増殖抑制効果の比較

HCMV を MOI=1 で HEL 細胞に吸着感染後、5 種類のクマザサ抽出液の成分の 3 倍希釈液を含む DMEM 培地で 7 日間培養した。この時の培養上清を採取し、プラークアッセイ法を行い、それぞれの HCMV に対する増殖抑制効果について比較した。

(図 4). この結果、ウイルス感染 3 時間後までに triclin で処理するとウイルスの増殖に抑制が見られた。しかし、この抑制効果はウイルス感染 8 時間後に添加した場合には見られなかった。また、ウイルス感染前にあらかじめ HEL 細胞を triclin で 1 時間処理しておく、ウイルス感染 1 時間後に triclin で処理した場合と同様のウイルスの

増殖抑制が見られた (図 5)。このことは triclin が、クマザサ抽出液と同様に<sup>9,10</sup> ウイルス感染後の添加で増殖を抑制するだけでなく、ウイルス感染前の処理によっても、増殖抑制効果があることを示している。このため、ウイルス感染前の処理でウイルスの発現にどのような影響があるか調べた。

### 3. 蛋白質合成の抑制

Tricin 前処理による HCMV 感染に対する影響を調べるため、HCMV の発現に重要な IE 蛋白質及び Late 蛋白質の発現について検討した。Tricin 前処理後、ウイルスを感染させ、感染後 1, 3, 6 日目の細胞を用いウエスタンブロット法による解析を行った。Tricin 前処理を行うことにより、感染後 1 日目及び 3 日目の IE2 蛋白質の発現に抑制が見られた (図 6-A)。これに対し、IE1 蛋白質の発現はいずれの場合も抑制されなかった。また、ウイルス DNA および粒子形成に重要な後期蛋白質 (late) の感染後 6 日目の発現を調べたところ、triclin 添加により発現に抑制が見られた (図 6-B)。

### 4. Tricin による HCMV の遺伝子発現の抑制

ウエスタンブロット法の結果から、triclin で感染前処理をすることにより、HCMV 遺伝子の発現調節に重要な役割をもつ IE2 蛋白質の発現に影響している可能性が示された。このため、triclin による HCMV の遺伝子発現への

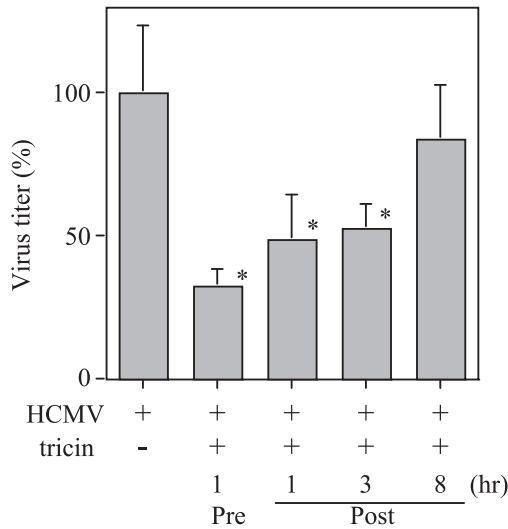


図4 クマザサ抽出液の成分“triclin”の添加時間の違いによるウイルス増殖への影響

(1) Triclin (最終濃度 0.4  $\mu\text{M}$ ) を含む DMEM 培地で 1 時間培養した後、HCMV 溶液を MOI=1 で 37°C 1 時間吸着感染させた (前処理: pre), (2) HCMV 溶液を MOI=1 で、37°C 1 時間吸着感染した後、triclin を含む DMEM 培地で培養した (ウイルス感染 1 時間後処理: Post), (3) 同様に、HCMV 感染後、2 時間 DMEM 培地で培養した後、すなわちウイルス感染から 3 時間後に triclin を含む DMEM 培地に交換した (ウイルス感染 3 時間後処理: Post), (4) またウイルス感染から 8 時間後に triclin を含む DMEM 培地に交換した (ウイルス感染 8 時間後処理: Post) とした. Triclin は、最終濃度 0.4  $\mu\text{M}$  になるように調製した. これらを 6 日間培養し、培養上清中に放出される感染性ウイルスの量をプラークアッセイ法により測定した (データは Mean $\pm$ SD で表した.  $n=3$ , \*:  $p<0.05$  triclin 未処理の値との比較).

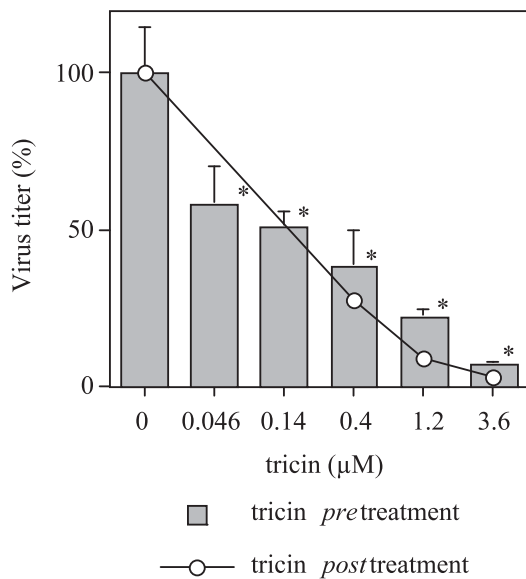


図5 クマザサ抽出液の成分“triclin”前処理による HCMV の増殖抑制

HEL 細胞を triclin を含む DMEM 培地で 1 時間前処理した後、HCMV を MOI=1 で HEL 細胞に吸着感染した. 培養上清を採取し、プラークアッセイ法を行い、上清中に放出されたウイルス数を定量した (データは Mean $\pm$ SD で表した.  $n=3$ , \*:  $P<0.05$  Triclin 未処理の値との比較).

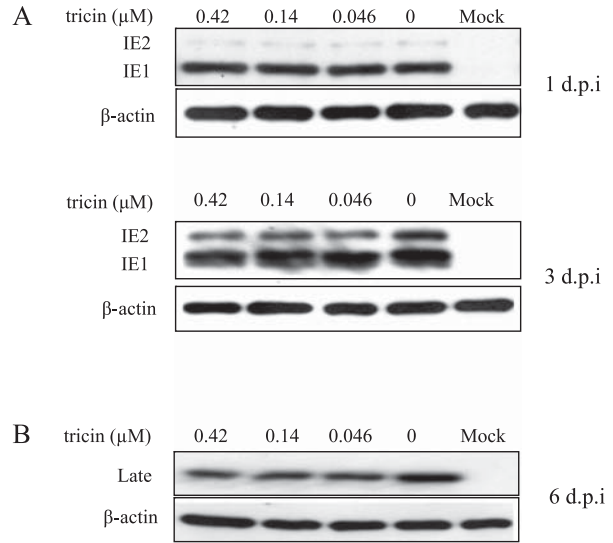


図6 “Triclin”添加によるウイルス蛋白質合成への影響

HEL 細胞を triclin を含む DMEM 培地で 1 時間前処理した後、HCMV を MOI=1 で HEL 細胞に吸着感染した. 1, 3 及び 6 日後に細胞を可溶化して回収した. HCMV の IE タンパク質および late タンパク質を認識する抗体を用いた Western blot 法により解析を行った.

影響をリアルタイム RT-PCR 法により調べた. ウイルス感染後 3 日目の triclin 前処理感染細胞から得た total RNA を用い IE2 遺伝子の発現を調べた結果 (図 7-A), 0.4  $\mu\text{M}$  の triclin 処理により抑制が見られた. さらに、ウイルス DNA の複製に関与する遺伝子 (UL54) の発現を調べたところ (図 7-B), IE2 遺伝子と同様にその発現に濃度依存的な抑制が見られた.

### 5. Triclin による HCMV 粒子に対する影響

Triclin のウイルス粒子に対する直接傷害試験を行ったところ、triclin を加えてもウイルスの増殖に抑制が見られなかった (図 8). このことから、triclin による HCMV の増殖抑制作用は、直接傷害作用によるものではないことが示唆された.

### 考察

わが国では、HCMV 感染症に対する治療薬として GCV と PFA の使用が認可されているが、薬物耐性 HCMV の出現が、現在臨床上大きな問題となっている. このため、作用機序が異なる新たな治療薬の開発が急務となっている. 我々は、古くから民間療法薬として用いられてきたクマザサに以前から着目し、その抗ウイルス活性について報告してきた<sup>9,10</sup>. 今回、クマザサ抽出液から 5 つの成分が分離・精製され、構造が決定された (図 1). これらの成分に抗ウイルス効果があるか、クマザサ

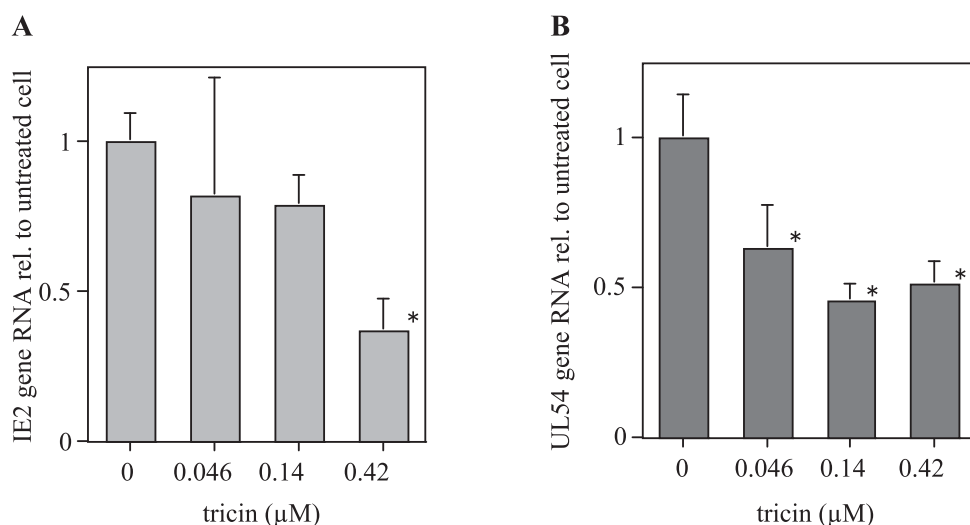


図7 “Tricin”によるHCMVの主要前初期(IE)遺伝子, 及び後期遺伝子(Late)の発現に対する抑制効果

Tricinを含むDMEM培地で1時間前処理したHEL細胞に, HCMVをMOI=1で吸着感染した後, 3日及び6日目のtotal RNAを抽出した. 逆転写反応後, IE2(A), ウイルスのDNA polymerase遺伝子を認識するUL54遺伝子(B)及びβ-アクチンを認識するプライマーを用いたリアルタイムPCR法を行った. ウイルス遺伝子の発現量は, 細胞のβ-アクチンの発現量で標準化し, tricin未処理のものと比較した(データはMean±SDで表した. n=3).

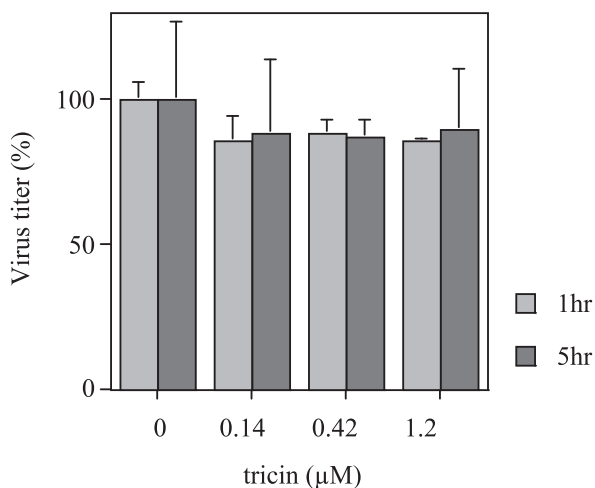


図8 “Tricin”のHCMVに対する直接障害作用

Tricin(最終濃度1.2-0.14 μM)と感染性のウイルス粒子(MOI=1)を混合し, 37°Cで1時間または5時間処理した後, HEL細胞に吸着感染させた. ブラックアッセイ法により, 培養上清中に放出されたウイルスの量を測定した(データはMean±SDで表した. n=3).

抽出液による抗ウイルス効果の結果との関係を含め検討した.

分離された5つの化合物をウイルス感染HEL細胞に添加することにより, ウイルス粒子の産生が抑制され, その中でtricinに最も強い抗ウイルス効果があることがわかった(図3). 近年, 植物成分による抗ウイルス作用の機序として, フラボノイド類によるウイルスの細胞への吸着阻害が報告されている<sup>20,21)</sup>ことから, フラボン誘

導体であるtricinがウイルス増殖のどの時期に作用しているのか, ウイルス感染細胞へのtricinの処理タイミングの時間を変えた実験を行った. この結果, 図4に示すようにウイルス感染後3時間までにtricin添加するとその増殖が抑制されたが, ウイルス感染8時間後に添加しても抑制が見られず, tricinがウイルス感染の初期に作用している可能性が示唆された. さらに, ウイルス感染前にあらかじめHEL細胞をtricinで処理したところ, tricin後処理の場合と同様の濃度依存的な増殖抑制を示した(図5). クマザサ抽出液が, ウイルス感染後の処理で効果を示し, ウイルス感染前処理ではほとんど抑制効果を示さなかったのに対し<sup>9,10)</sup>, tricinのこの効果は非常に興味深いものである. このため, ウイルス感染前または感染後のどちらの処理タイミングにおいても抑制効果を示すtricinの, ウイルスの遺伝子及び蛋白質の発現に対する影響を調べたところ(図6), 0.4 μM tricin処理により特にIE2遺伝子の発現に抑制が見られた(図7). またそれに続くウイルスの発現に重要なIE2蛋白質の発現も同様に抑制され, クマザサ抽出液同様にウイルスの感染初期に発現し, その増殖に重要なIE遺伝子を抑制していることがわかった. さらに感染後6日目のlate蛋白質の発現量にも抑制が見られたが, これはIE2遺伝子の発現が抑制された結果, それに続く遺伝子発現が遅れたため, 蛋白質の合成も減少したと考えられる.

また, tricinによるウイルスに対する直接的な毒性は観察されなかったことから(図8), ウイルス粒子を直接傷害するのではなく, tricinで前処理することにより, 細胞

に何らかの影響を与えることにより、ウイルス感染後、その発現を抑制するように働くことが推測された。

今回得られた5種類の化合物の中で、フラボン誘導体である tricin に最も強い抗ウイルス効果があることがわかり、その効果はクマザサ抽出液と同様に、ウイルスの感染直後から発現し以後のウイルス複製の調節をカスケード的に規則正しく行っている IE 遺伝子を抑制することがわかった。これは、現在わが国で使用されている、DNA 合成酵素に作用することによりウイルス DNA の複製を阻害する抗 HCMV 薬の GCV と PFA とは明らかに作用機序を異にするものである。

また tricin はウイルス感染の前処理、及び後処理のどちらにおいても抗ウイルス効果を示したことから、抗ウイルス効果の作用機序の可能性として、ウイルス粒子の細胞への吸着の阻害作用も示唆された。しかし、4°C における吸着阻害に対する予備実験では、約 20% 程度の阻害効果が見られたのみであったことから、tricin 前処理による抑制効果は、ウイルスの吸着阻害による影響というよりはむしろ、細胞内の様々な防衛機構が活性化されることにより、ウイルス感染が抑制されるように働いている可能性の方が大きいと考えられる。

今後、ウイルス感染に伴う細胞側の因子の作用を含めて、tricin による抗 HCMV 活性についてさらに検討を加え、その詳細な作用機序を明らかにする必要がある。

## 結 論

以上、本研究の結果から、クマザサ抽出液から分離・精製した tricin に抗 HCMV 効果があることが判明した。この tricin による抗 HCMV 効果は、クマザサ抽出液と異なり、ウイルス感染前に処理をしても効果があることがわかった。また、その作用は、現在使用されている GCV などとは異なる、IE 遺伝子を抑制するという作用機序の可能性を示すものであり、今後さらに検討を進めたい。

## 謝 辞

本研究は、北陸大学薬学部生体防御薬学教室で行われたものであり、研究遂行にご協力いただいた大学院生諸氏に深謝します。本研究は北陸大学特別助成金により遂行されたものであり心より謝意を表します。

## 参 考 文 献

1) Fields BN, Knipe DM, Howly PM, et al. "Fields Virology" 3rd ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. 1996; 2493-

2523.  
 2) Ho M. Virus infections after transplantation in man. Arch Virol 1977; 55(1-2): 1-24.  
 3) Sissons JG, Carmichael AJ. Clinical aspects and management of cytomegalovirus infection. J Infect 2002; 44(2): 78-83.  
 4) Freitas VR, Fraser-Smith EB, Matthews TR. Increased efficacy of ganciclovir in combination with foscarnet against cytomegalovirus and herpes simplex virus type 2 in vitro and in vivo. Antiviral Res 1989; 12(4): 205-212.  
 5) Buerger I, Reefschaeger J, Bender W. A novel nonnucleoside inhibitor specifically targets cytomegalovirus DNA maturation via the UL89 and UL56 gene products. J Virol 2001; 75(19): 9077-9086.  
 6) McSharry JJ, McDonough A, Olson B, et al. Inhibition of Ganciclovir-susceptible and -resistant human cytomegalovirus clinical isolates by the benzimidazole L-riboside 1263W94. Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8(6): 1279-1281.  
 7) Chuen GB, Kurata T, Kato H. クマザサの防腐効果について. J Antibact Antifung Agents 1983; 11(29): 69-75.  
 8) Nguyen VC, Kurata T, Kato H, et al. Antimicrobial activity of Kumazasa (*Sasa albo-marginata*). Agric Biol Chem 1982; 46(4): 971-978.  
 9) Yamada R, Akuzawa K, Bi C, et al. Anti-human cytomegalovirus activity of hot water extract from *Sasa senanensis* Rehder. J Com Alter Med 2009; 6(1): 17-25.  
 10) Asumi S, Kunitomo W, Mamoru K et al. Anti-human cytomegalovirus activity of constituents from *Sasa albo-marginata* (Kumazasa in Japan) Antivir Chem Chemother 2008; 19: 125-132.  
 11) Jacobs JP, Jones CM, Belle JP. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. Nature 1970; 227: 168-170.  
 12) Furukawa T, Fioretti A, Plotkin S. Growth characteristics of cytomegalovirus in human fibroblasts with demonstration of protein synthesis early in viral replication. J Virol 1973; 11(6): 991-997.  
 13) Wentworth BB, French L. Plaque assay of cytomegalovirus strains of human origin. Proc Soc Exp Biol Med 1970; 135: 253-258.  
 14) Sadanari H, Yamada R, Ohnishi K, et al. SUMO-1 modification of the major immediate-early (IE) 1 and 2 proteins of human cytomegalovirus is regulated by different mechanisms and modulates the intracellular localization of the IE1, but not IE2, protein. Arch Virol 2005; 150: 1763-1782.  
 15) Nishiwaki M, Fujimuro M, Teishikata Y, et al. Epidemiology of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infections in peripheral blood leukocytes revealed by a multiplex PCR assay. J Med Virol 2006; 78(12): 1635-1642.  
 16) Petrik DT, Schmitt KP, Stinski MF. Inhibition of cellular DNA synthesis by the human Cytomegalovirus IE86 protein is necessary for efficient virus replication. J Virol 2006; 80(8): 3872-3883.  
 17) Li H, Dummer S, Estes WR, et al. Measurement of human



- cytomegalovirus loads by quantitative real-time PCR for monitoring clinical intervention in transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2003; 41(1): 187–191.
- 18) Meier JL, Keller MJ, McCoy JJ. Requirement of multiple *cis*-acting elements in the human cytomegalovirus major immediate-early distal enhancer for viral gene expression and replication. *J Virol* 2002; 76(1): 313–326.
- 19) Petrik DT, Schmitt KP, Stinski MF. The autoregulatory and transactivating functions of the human cytomegalovirus IE86 protein use independent mechanisms for promoter binding. *J Virol* 2007; 81(1): 5807–5818.
- 20) Friedman M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51: 116–134.
- 21) Evers DL, Chao CF, Wang X, et al. Human cytomegalovirus-inhibitory flavonoids: studies on antiviral activity and mechanism of action. *Antiviral Research* 2005; 68: 124–134.

## ABSTRACT

### Anti-Human Cytomegalovirus Activity of Chemical Constituents from Kumazasa Hot Water Extract

Kazuhiko AKUZAWA<sup>1</sup>, Rie YAMADA<sup>1</sup>, Changxiao BI<sup>1</sup>, Hidetaka SADANARI<sup>1</sup>, Keiko MATSUBARA<sup>1</sup>, Yuuzou TSUCHIDA<sup>2</sup>, Kunitomo WATANABE<sup>3</sup>, Masayuki NINOMIYA<sup>4</sup>, Mamoru KOKETSU<sup>4</sup>, Tsugiyu MURAYAMA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University

<sup>2</sup> Hououdou Co. Ltd.

<sup>3</sup> Life Science Research Center, Gifu University

<sup>4</sup> Department of Materials Science and Technology, Faculty of Engineering, Gifu University

**Objective:** Anti-human cytomegalovirus (HCMV) activity of 5 compounds, especially triclin, isolated from Kumazasa extract were investigated in the human embryonic lung (HEL) fibroblast cell.

**Method:** This study examined the effect of triclin on HCMV replication, viral-specific major immediate early (IE) gene expression, and protein synthesis.

**Results:** Pretreatment of HEL cells before HCMV infection with triclin inhibited viral production in a dose-dependent manner, as well as posttreatment of HCMV-infected HEL cells with triclin. Real-time RT-PCR assay and Western blotting analysis indicated that triclin decreased expression of the HCMV IE gene in virus-infected HEL cell.

**Conclusion:** These data suggest that the primary mechanism of anti-HCMV activity for triclin, isolated from Kumazasa hot water extract, inhibit IE gene expression.

**Key words:** Human cytomegalovirus, *Sasa senanensis*, Antiviral activity