

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-314316**(P2005-314316A)**

(43) 公開日 平成17年11月10日(2005.11.10)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/352	A 6 1 K 31/352	4 B 0 1 8
A 2 3 L 1/30	A 2 3 L 1/30	B 4 C 0 6 2
A 6 1 K 7/00	A 6 1 K 7/00	D 4 C 0 8 3
A 6 1 K 7/40	A 6 1 K 7/40	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/353	A 6 1 K 31/353	4 C 0 8 8
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 12 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2004-135462 (P2004-135462)
 (22) 出願日 平成16年4月30日 (2004. 4. 30)

(71) 出願人 000004477
 キッコーマン株式会社
 千葉県野田市野田250番地
 (74) 代理人 100125542
 弁理士 鈴木 英之
 (72) 発明者 徳武 昌一
 千葉県野田市野田250番地キッコーマン
 株式会社内
 (72) 発明者 片山 弘
 千葉県野田市野田250番地キッコーマン
 株式会社内
 (72) 発明者 吉仲 由之
 東京都江戸川区平井7-33 平井住宅7
 -201号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗SARSコロナウイルス剤

(57) 【要約】

【課題】

新規な抗SARSコロナウイルス剤、SARSコロナウイルス感染症の予防剤または治療剤を提供すること。

【解決手段】

(1) プロアントシアニジン、カテキンまたはブドウ抽出物を有効成分とする、抗SARSコロナウイルス剤。

(2) プロアントシアニジン、カテキンまたはブドウ抽出物を有効成分とする、SARSコロナウイルス感染症の予防剤または治療剤。

(3)

上記の抗SARSコロナウイルス剤またはSARSコロナウイルス感染症の予防剤もしくは治療剤を含有する、飲食品、医薬品または化粧品。

(4) プロアントシアニジン、カテキンまたはブドウ抽出物を含有し、SARSコロナウイルス感染症の予防または改善のために用いられるものである旨の表示を付した飲食品。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プロアントシアニジンまたはカテキンを有効成分とする、抗 S A R S コロナウイルス剤。

【請求項 2】

ブドウ抽出物を有効成分とする、抗 S A R S コロナウイルス剤。

【請求項 3】

プロアントシアニジンまたはカテキンを有効成分とする、S A R S コロナウイルス感染症の予防剤または治療剤。

【請求項 4】

ブドウ抽出物を有効成分とする、S A R S コロナウイルス感染症の予防剤または治療剤。 10

【請求項 5】

S A R S コロナウイルス感染症が、S A R S である請求項 3 または 4 記載の予防剤または治療剤。

【請求項 6】

請求項 1 または 2 項記載の抗 S A R S コロナウイルス剤を含有する、飲食品、医薬品または化粧品。

【請求項 7】

請求項 3 または 4 に記載の S A R S コロナウイルス感染症の予防剤または治療剤を含有する、飲食品、医薬品または化粧品。

【請求項 8】

プロアントシアニジン、カテキンまたはブドウ抽出物を含有し、S A R S コロナウイルス感染症の予防または改善のために用いられるものである旨の表示を付した飲食品。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗 S A R S コロナウイルス剤、S A R S コロナウイルス感染症の予防剤または治療剤に関する。

【背景技術】

【0002】

S A R S (Severe Acute Respiratory Syndrome: 重症急性呼吸器症候群、新型急性肺炎とも言う) は、S A R S コロナウイルスを病原体とする新しい感染症であり、中国広東省に端を発し、香港、北京など中国の他の地域にも拡大し、また、台湾、カナダ、シンガポール、ベトナムなど世界中のいくつかの国でも大きな問題となっている。 30

【0003】

主な症状としては、38 以上の発熱、咳、息切れ、呼吸困難などで、胸部レントゲン写真で肺炎または呼吸窮迫症候群の所見が見られる。また、頭痛、悪寒戦慄、食欲不振、全身倦怠感、下痢、意識混濁などの症状が見られることもある。

【0004】

原因となる病原体は世界保健機関 (W H O) により新型のコロナウイルスであると決定され、「S A R S コロナウイルス」と名付けられた。 40

抗 S A R S コロナウイルス剤として有用な物質を探索し、S A R S コロナウイルス感染症の予防剤または治療剤として利用することは医学上急務である。

【0005】

ところで、ポリフェノール、プロアントシアニジン、アントシアニン、カテキン等は、各種植物体中に存在する化合物群であり、抗ウイルス活性を含む種々の生理活性を有することが知られている。例えば、抗ウイルス活性に関しては、ブドウ色素 (アントシアニン色素等) を含有しオーエスキー、鶏ガンボ口病、ニューカスル病、イヌヘルペス、パルボウイルスに有効な抗ウイルス剤 (特許文献 1 参照)、茶ポリフェノール (カテキン類等) を含有する家畜のコロナウイルス感染予防剤 (特許文献 2 参照)、インフルエンザウイル 50

ス、パラインフルエンザウイルス、パラミクソウイルス(RSV)に有効なプロアントシアニジンポリマー（特許文献3参照）などが公知である。

【0006】

【特許文献1】特開平8-27015号公報

【特許文献2】特開2000-44473号公報

【特許文献3】特許第3448052号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、新規な抗SARSコロナウイルス剤、SARSコロナウイルス感染症の予防剤または治療剤を提供することにある。 10

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、プロアントシアニジン、カテキンおよびブドウ抽出物が抗SARSコロナウイルス活性（SARSコロナウイルスの増殖阻害活性）を有することを見出し、本発明を完成した。すなわち本発明は、以下に関する。

（1）プロアントシアニジンまたはカテキンを有効成分とする、抗SARSコロナウイルス剤。

（2）ブドウ抽出物を有効成分とする、抗SARSコロナウイルス剤。

（3）プロアントシアニジンまたはカテキンを有効成分とする、SARSコロナウイルス感染症の予防剤または治療剤。 20

（4）ブドウ抽出物を有効成分とする、SARSコロナウイルス感染症の予防剤または治療剤。

（5）SARSコロナウイルス感染症が、SARSである上記（3）または（4）記載の予防剤または治療剤。

（6）上記（1）または（2）記載の抗SARSコロナウイルス剤を含有する、飲食品、医薬品または化粧品。

（7）上記（3）または（4）に記載の抗SARSコロナウイルス剤を含有する、飲食品、医薬品または化粧品。

（8）プロアントシアニジン、カテキンまたはブドウ抽出物を含有し、SARSコロナウイルス感染症の予防または改善のために用いられるものである旨の表示を付した飲食品。 30

【発明の効果】

【0009】

本発明の抗SARSコロナウイルス剤は、SARSコロナウイルスの増殖阻害活性を示すので、SARSに代表されるSARSコロナウイルス感染症の予防剤または治療剤として使用できる。本発明は、SARSコロナウイルス感染症の拡大阻止、感染者の症状軽減のために有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

以下、本発明を具体的に説明する。 40

〔プロアントシアニジンまたはカテキンを有効成分とする抗SARSコロナウイルス剤〕

本発明の抗SARSコロナウイルス剤は、プロアントシアニジンを有効成分とする。プロアントシアニジンとは、各種植物体中に存在する縮合型タンニン、すなわちフラバン-3-オールまたはフラバン-3,4-ジオールを構成単位として重合により結合した化合物群であって、酸処理によりシアニジン、デルフィニジン、ペラルゴニジン等のアントシアニジンを生成するものである。本発明のプロアントシアニジンには、上記構成単位の重合体（2量体以上）であるプロシアニジン、プロデルフィニジン、プロペラルゴニジン等が含まれる。また、本発明のプロアントシアニジンは上記化合物の立体異性体、配糖体、没食子酸エステルまたはカフェ酸エステル等の各種誘導体が含まれる。

【0011】

本発明においてプロアントシアニジンは、種々の分子量（重合度）のプロアントシアニジンの混合物として使用できる。また、分子量（重合度）に応じて分画したプロアントシアニジン組成物を単独または混合し、抗SARSコロナウイルス剤として使用することもできる。実施例に示す通り、平均重合度 = 4、平均重合度 = 11、2 ~ 4量体または5 ~ 7量体のプロアントシアニジン組成物はいずれも抗SARSコロナウイルス剤活性を示す。

【0012】

プロアントシアニジンは、植物体や微生物体からの抽出法、発酵法、化学的もしくは酵素的合成法等により得ることができる。また、プロアントシアニジンとしては市販品、例えばブドウ種子由来の商品名「グラヴィノール」（キッコーマン（株））、りんご未熟果由来の商品名「アップルフェノン」（ニッカウヰスキー（株））、海岸松の樹皮由来の商品名「ピクノジェノール」（ホーファーリサーチ社（スイス））等が使用できる。

10

【0013】

プロアントシアニジンを抽出するための植物体としては、ブドウ、クランベリー、カカオ、リンゴ、小豆、柿、キャベツ、大麦、麦芽、クルミ、アーモンド、杉、桧、松、栃、樫、乾姜（カンキョウ）、茗荷（ミョウガ）、葉生姜（ハショウガ）等が利用できる。プロアントシアニジンが得られる限り植物体のどの部分を抽出してもよく、例えば、花、実、種子、果実、果肉、皮類、根、樹木、樹皮、葉などの組織が使用できる。植物体は、乾燥物、生のもの、発酵させたものの何れでもよい。更に、果実のジュース、果実酒、ビール類、またはそれらの製造の際副産物として生成する粕類、または植物体の加工品なども利用できる。プロアントシアニジン含有量が高いという点で、抽出原料としてはブドウの種子または果皮が好適である。ブドウ原料から高純度のプロアントシアニジンを得るためには、特開平11-080148公報記載の方法を使用すればよい。

20

【0014】

各種の植物体原料を、溶媒を用いて適当な条件下で抽出し、抽出液から溶媒を減圧留去などによって除去すれば、濃縮物や乾燥物の状態で粗プロアントシアニジン画分が得られる。抽出に際しては、還流させながら抽出を行うことが好ましい。溶媒とは例えば、冷水、熱水、低級アルコール、アセトン、アルキルケトン、酢酸、酢酸エチル、n-ヘキサン、液体二酸化炭素等であり、特に含水低級アルコールおよび含水アセトンが好適である。溶媒は2種類以上混合してもよい。

30

【0015】

上記で得られた粗プロアントシアニジンを本発明の抗SARSコロナウイルス剤としてもよいが、上記で得られた粗プロアントシアニジン画分を更に、セファデックス、ポリアミド、シリカゲル、ODS等を用いたカラムクロマトグラフ、セルロース膜等を用いた膜分離、酢酸エチル-水等を用いた液液分離など精製・分離・脱色操作を行うことにより、より高純度の、あるいは望む重合度のプロアントシアニジンを得ることができる。

【0016】

また、粗プロアントシアニジンにサッカロマイセス属、チゴサッカロマイセス属等に属する酵母を添加し、発酵させれば、抽出物中に不純物として含有される糖分が資化されてアルコールと二酸化炭素になり、相対的にプロアントシアニジン純度を向上させることもできる。

40

また、本発明の抗SARSコロナウイルス剤は、カテキンを有効成分とする。カテキン（Catechin）とは、フラバン-3-オールの代表的化合物であり、縮合型タンニンの前駆体の1つである。本発明のカテキンには、カテキン類及び没食子酸エステル等のカテキン誘導体が含まれ、具体的には例えば、（+）-カテキン、（-）-エピカテキン、（+）-ガロカテキン、（-）-エピガロカテキン、（-）-エピカテキンガレート、（+）-カテキンガレート、（-）-エピガロカテキンガレート等が挙げられる。カテキンは、植物体や微生物体からの抽出法、発酵法、化学的もしくは酵素的合成法等により得ることができる。カテキンは、茶やブドウ等の植物原料の有機溶媒抽出物から、プロアントシアニジンを精製する方法と同様の方法によって得ることができる。

50

〔ブドウ抽出物を有効成分とする抗SARSコロナウイルス剤〕

また、本発明の抗SARSコロナウイルス剤は、ブドウ抽出物を有効成分とする。抗SARSコロナウイルス活性を有する成分が得られる限り、ブドウ抽出物の組成は限定されないが、プロアントシアニジンを高濃度に含有するものが特に好ましい。

【0017】

本発明のブドウ抽出物は、例えば以下の方法により調製可能である。

抽出原料となるブドウの種類は、白ブドウ、赤ブドウ、黒ブドウ等のいずれでもよく、例えばシャルドネ種、リースリング種、ミラトルガウ種、ナイアガラ種、ネオ・マスカット種、甲州種、白羽種（リカチテリ種）、巨峰種、デラウェア種、セレサ種、マスカットベリーA種等が挙げられる。

【0018】

上記ブドウの種子、果実、果肉、皮類が抽出に供される。飲料やワイン製造において利用されたブドウ果実を圧搾して果汁を採取した残渣、すなわち搾汁粕や赤ワイン製造の際の前発酵後に圧搾して得られる搾汁粕を抽出に供してもよい。種子は通常搾汁粕中に約5～20%（w/w）含まれるが、プロアントシアニジン含量が高く、糖類などの夾雑物の含量も少ないため、好適な原料である。

【0019】

上記のブドウ原料を、水又は有機溶媒等を用いて適当な条件下で抽出することにより有効成分が得られる。抽出に際しては、還流させながら抽出を行うことが好ましい。有機溶媒とは例えば、メタノール、エタノール、イソプロパノール、n-ブタノール等の水溶性アルコール類、アセトン、エチルメチルケトン、アセトニトリル、1,4-ジオキサン、N,N-ジメチルホルムアミド（DMF）、酢酸等である。水溶性有機溶媒は単独で用いてもよいが、任意の比で水と混合して用いてもよい。

毒性が低いこと、沸点が比較的低いため抽出後の除去が容易である、入手容易等の理由から、水溶性有機溶媒としてはエタノールが好ましい。抽出効率を高く、不純物の割合を少なくするためには、エタノール：水の混合比は1：1～4：1（v/v）が好ましい。

【0020】

抽出する際のブドウ原料（無水物換算）に対する溶媒の量は特に限定しないが、通常1～20倍量（v/w）、好ましくは2～6倍量である。また必要により少量の界面活性剤（例えばショ糖脂肪酸エステル等）や酸化防止剤（例えばアスコルビン酸等）などを加えてもよい。また必要により、窒素やアルゴンなどの不活ガス雰囲気下で抽出を行ってもよい。

ブドウ原料の抽出に際しては、還流させながら抽出を行うことが好ましい。抽出時間は、溶媒量、溶媒の種類、温度等の抽出条件に左右されるが、通常10分～24時間であり、好ましくは30分～2時間程度である。

なお抽出前にブドウ原料を水と接触させ、水溶性の不純物を減少させてから抽出を行うことにより、抽出物中の有効成分の含量を向上させることができる。

【0021】

上記で得られたブドウ抽出物を本発明の抗SARSコロナウイルス剤として使用することもできるが、更に、セファデックス、ポリアミド、シリカゲル、ODS等を用いたカラムクロマトグラフ、セルロース膜等を用いた膜分離、酢酸エチル-水等を用いた液液分離、酵母等の微生物の添加による不純物の分解など精製・分離・脱色操作を行うことにより、より高純度に有効成分を含有する抽出物を得ることができる。

【0022】

上記によって得られるブドウ抽出物には、プロアントシアニジン、カテキンおよびその他の有効成分が含まれており、抗SARSコロナウイルス活性を有することから、本発明の抗SARSコロナウイルス剤として有用である。

〔SARSコロナウイルス感染症の予防剤または治療剤〕

プロアントシアニジン、カテキンまたはブドウ抽出物は、抗SARSコロナウイルス活性を有するので、SARSコロナウイルス感染症の予防剤または治療剤として使用できる

10

20

30

40

50

。SARSコロナウイルス感染症とは、コロナウイルスの感染によって引き起こされるSARSの症状、具体的には例えば、38以上の発熱、咳、息切れ、呼吸困難、肺炎、呼吸窮迫症候群、頭痛、悪寒戦慄、食欲不振、全身倦怠感、下痢、意識混濁等である。

【0023】

プロアントシアニジンまたはカテキンを、SARSコロナウイルス感染症の予防または治療用として使用する場合、プロアントシアニジンまたはカテキンの乾燥重量として例えば50～1000mg/成人/日、好ましくは100～400mg/成人/日程度の量を、服用者が経口あるいは非経口的に摂取すればよい。上記の摂取量は、摂取者の体調、性別、年齢、摂取の目的（予防、治療または症状軽減等）に応じて適宜設定すればよい。

また、ブドウ抽出物は、SARSコロナウイルス感染症の予防または治療用として使用する場合も、その摂取量は目的に応じて適宜設定すればよい。

10

〔本発明の剤を含有する、飲食品、医薬品または化粧品〕

本発明の抗SARSコロナウイルス剤、SARSコロナウイルス感染症の予防剤または治療剤（以下「本発明の剤」と総称する）は、そのままあるいは他の成分と混合し、飲食品、医薬品または化粧品として使用できる。

【0024】

本発明の剤を飲食品として使用する場合、本発明の剤を、適当な飲食品、例えばパン、ビスケット、シリアル、麺類をはじめとするでんぷん系食品、あるいはキャンディー、ガム、アイスクリーム、乳製品、茶飲料、ジュース、炭酸飲料、コーヒー飲料、調味料、惣菜に添加すればよい。また、本発明の剤は、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、シロップ剤またはドリンク剤タイプの機能性食品として使用することもできる。

20

なお、本発明の飲食品の一態様として、「プロアントシアニジン、カテキンまたはブドウ抽出物を含有し、SARSコロナウイルス感染症の予防または改善のために用いられるものである旨の表示を付した飲食品」を挙げることができる。当該飲食品においては、プロアントシアニジン、カテキンまたはブドウ抽出物を1種または混合して使用できる。

【0025】

本発明の剤を医薬品として使用する場合、他の成分とともに経口剤または非経口剤として製剤化することができる。経口剤としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、シロップ剤、ドリンク剤等が、非経口剤としては無菌溶液剤、懸濁液剤等の注射剤、軟膏剤、クリーム、水剤等の外用剤等が挙げられる。

30

製剤化において使用される他の成分とは例えば、他の抗ウイルス剤、デキストリン・セルロース等の賦形剤、ゼラチン・アラビアゴム等の統合剤、ステアリン酸マグネシウム等の潤滑剤、ゼラチン化澱粉、アルギン酸等の膨化剤、ショ糖・乳糖等の甘味料、セラック・砂糖等の被覆剤、香料、防腐剤、酸化防止剤、緩衝剤等である。また、カプセル剤の場合は、上記の材料に加えて油脂のような液体担体を含有させることもできる。

本発明の剤を化粧品として使用する場合、他の成分とともに化粧品に添加して使用すればよい。

【実施例1】

【0026】

実施例1では、被検物質であるブドウ抽出物、ブドウ抽出物由来のプロアントシアニジン、リンゴ由来のプロアントシアニジンおよびブドウ抽出物由来のカテキンの抗SARSコロナウイルス活性（SARSコロナウイルスの増殖阻害活性）を評価した。

40

【0027】

具体的には、SARSコロナウイルスを感染させたアフリカミドリザル腎臓由来のVerro細胞の培養細胞（急性感染系）に、被検物質を各種濃度となるように加え、一定時間後の培養上清中のウイルス量を測定した。同時に、非感染Verro細胞においてアクチン量を指標に被検物質各種濃度の細胞障害作用も測定した。細胞障害作用を示さない濃度において、被検物質の抗SARSコロナウイルス活性が認められた。

【0028】

1. ブドウ抽出物の調製

50

ブドウ抽出物の調製は、以下の方法により行った。

まず、白羽種、ミラトルガウ種、リースリング種、シャルドネ種のブドウ種子混合物 1000g を、30～40℃ で2時間水浸漬した後、固液分離して水溶性の不純物を除去した。次いで含水エタノール（エタノール：水の混合比が2：1（v/v））で約2時間還流抽出し、固液分離して得られた抽出液を約20%（w/v）まで減圧濃縮した。次いで濃縮物をスプレードライして約60gの乾燥粉末を得、乾燥粉末をブドウ抽出物とした。塩酸 - バニリン法による総フラバノール分析（R.B. Broadhurst, et al, J. Sci. Food Agric., Vol. 29, 788-794 (1978)）と総カテキン分析（S. Kitao, et al, Biosci. Biotech. Biochem, Vol.57, 2010-2015 (1993)）により該ブドウ抽出物が、プロアントシアニジン を約95%含有することを確認した。

10

【0029】

2. 各種のプロアントシアニジン画分の調製

上記1.で得たブドウ抽出物から、カテキン画分（フラバン-3-オールの1量体画分）およびプロアントシアニジン画分として、平均重合度 = 4（低分子画分）、平均重合度 = 11（高分子画分）、2～4量体の混合物、5～7量体の混合物を調製した。

上記によって得られたブドウ抽出物約20gを10%（w/v）の濃度で含水エタノール（エタノール：水の混合比が約1：9（v/v））に溶解した後、限外濾過メンブレン（ミリポア社製）処理を行った。透過側及び阻止側画分をそれぞれ減圧乾燥後凍結乾燥して、低分子画分約7g、高分子画分約13gを得た。

また上記と同様の方法によって得られた、ブドウ抽出物低分子画分約7gをセファデックスカラム（ファルマシアバイオテック社製）に供し、アセトン - エタノール混液で溶出し、薄層クロマトグラフィーで追跡しながら、目的画分を特定し、それぞれを減圧濃縮後、凍結乾燥してカテキン画分約2g、2～4量体の混合物約2g、5～7量体の混合物約1gを得た。2量体画分は2～4量体の混合物をさらに同じカラムクロマトグラフィーで精製して調製した。

20

【0030】

3. ウイルス感染と力価の測定

被検物質の抗SARSコロナウイルス活性は、以下の方法により測定した。SARSコロナウイルス（以下、「SARS-CoV」とも表現する）は、FFM-1株（Dr.HW. Doerr, Frankfurt University of Medicine, Germanyより分与）を用いた。培養細胞はVeroを用い、培地はダルベッコの最小必須（DMEM）に10%ウシ胎児血清を添加したものを、5% CO₂ 存在下において37℃ で培養した。なお、上記Vero細胞は（株）大日本製薬より購入した。

30

ウイルス感染は、90%単層が形成された培養細胞に、細胞1個当たりのウイルス量が0.1 (MOI=0.1, Multiplicity of infection)となる条件で行い(Tuker, P.C.ら, J. Virol. 71: 6106, 1997)、感染と同時に被検物質（ブドウ抽出物または各種のプロアントシアニジン画分）を培養液1ml当り100, 30, 10, 3, 1 μg/ml 加え、24、48時間後に培養液を回収しウイルス量を測定した。

【0031】

ウイルス力価の測定は、以下のようなプラーク形成法で行った。回収した培養上清を10%ウシ血清アルブミンを加えたPBA(-) (Mg²⁺, Ca²⁺ を含まない0.05Mリン酸緩衝液、0.15M NaCl、pH7.0)で10倍階段希釈し、各0.2mlづつをそれぞれのウエル（6ウエルプレート）に接種した。25℃ で60分間感染させた後1.0%メチルセルロースを加えたDMEM（5%ウシ胎児血清含有）で4日間培養した。培養後、メチルセルロースを取り除き、細胞を2.5%クリスタルバイオレット（30%エチルアルコール、1%シュウ酸アンモニウム中）で染色し、PBS(-)で3回洗浄/脱色後、プラーク数の平均値（3個のウエル）から1ml中のウイルス量を“PFU (Plaque Forming Unit)/mlとして算出した(Tuker, P.C.ら, J. Virol. 71:6106, 1997)。

40

また、以上の方法を用いて被検物質のIC₅₀値〔SARS-CoVの増殖を50%阻

50

害する濃度 (Inhibitory concentration、($\mu\text{g/ml}$)) を求めた。

【0032】

4. 被検物質の細胞毒性の測定法

被検物質の細胞毒性の測定は、以下の方法で行った。6ウェルプレートに培養したVer^o細胞(1well当たり2.5mlの培地、 2×10^6 個の細胞)に各検体を0、1、3、10、30、100 $\mu\text{g/ml}$ 加え、37℃で培養、48時間後に全細胞を0.4mlのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)用のサンプルバッファーに回収し、全タンパク質をSDS-PAGEで分離し、クマージー・ブリリアントブルーR250(CBB)で染色/7%酢酸で脱色後、画像をCCDカメラで撮影し画像解析ソフト(The Analytical Imaging System AIS. アマシャム/ファルマシア社)によりアクチンバンドの濃度を測定した。添加検体0 $\mu\text{g/ml}$ を1(対照)とし、相対的な濃度より細胞障害の程度を測定した(Nakatsue, M.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 253:59, 1998)。

【0033】

また、別法として同様の資料をSDS-PAGEで分離後、タンパク質をPVDF膜(Polyvinylidene fluolide)に転写後、アクチン、Bcl-2などの標準タンパク質の抗体(サンタクルズ社)で免疫プロットを行い、同様に画像解析から相対的な細胞障害を測定した。免疫プロットには一次抗体として抗ウサギ抗体、二次抗体にはアルカリホスファターゼで標識した抗ウサギ-ヤギ抗体(サンタクルズ社)を用い、NBT(ニトロブルーテトラゾリウム塩、ベーリンガー社)による発色で検出した(Yoshinaka, Y.ら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 261:139, 1999)。

SARS-CoV感染後のVer^o細胞の生存とウイルス増殖を経時的に示し、上記方法の項で記載したようにアクチン量を免疫プロット法で感染0日のアクチンの量を1(細胞数 2×10^6)とし定量した。同様に被検物質で2日間処理した細胞についても被検物質を含まない検体を1として比較し、CTC₅値〔5%細胞障害(Cyto-toxic concentration)が認められる濃度($\mu\text{g/ml}$)〕を求めた。

【0034】

〔結果：被検物質の抗SARSコロナウイルス活性〕

ウイルス感染と同時に各被検物質を加えて24時間培養したVer^o細胞の上清中のウイルス力価を図1に示す。図中の「Crude」はブドウ抽出物、「High」はプロアントシアニジンの平均重合度=11のプロアントシアニジン(高分子画分)、「Low」は平均重合度=4のプロアントシアニジン(低分子画分)、「Dimer」は2量体のプロアントシアニジン、「2-4mer」は2~4量体のプロアントシアニジンの混合物、「5-7mer」は5~7量体のプロアントシアニジンの混合物、「C1」はリンゴ由来のプロアントシアニジン3量体(コスモバイオ社)を示す。また、「Monomer」はカテキン(フラバノール)を示す。

【0035】

図1に示すように、各被検物質のSARS-CoVに対する増殖阻害効果は濃度依存的であるとともに、分子量に依存的であった。Crudeや高分子画分では濃度100 $\mu\text{g/ml}$ で抗ウイルス活性が見られたが、同時に細胞障害も観察された。

【0036】

上記3.4.の実験結果から、各被検物質のIC₅₀値と細胞障害のCTC₅値を求め、表1にまとめた。ブドウ由来のプロアントシアニジンはどの画分においても細胞障害が見られない濃度でSARS-CoVの増殖を阻害する。IC₅₀/CTC₅の比は比較的低分子のものが高い値を示した。

また、ウイルス液(5×10^7 PFU/ml)と各被検物質液(100 $\mu\text{g/ml}$)を混合し37℃で60分反応させウイルスの不活化を調べた。5~10%の不活化が観察されるが、顕著な直接作用は認められなかった。

以上の結果より、ブドウ抽出物、プロアントシアニジンおよびカテキンは抗SARSコロナウイルス活性を有し、抗SARSコロナウイルス剤、SARSコロナウイルス感染症

の予防剤または治療剤として有用であることが示された。

【0037】

【表1】

被検物質名	IC ₅₀ (μ g/ml)	CTC ₅ (μ g/ml)
ブドウ抽出物	4.0	10
ブドウ抽出物由来のカテキン画分	平均重合度=11 (高分子画分)	6.0
	平均重合度=4 (低分子画分)	8.0
	2量体	11.5
	2~4量体の混合物	11.0
	5~7量体の混合物	10.5
ブドウ抽出物由来のカテキン画分	12.0	75
リンゴ由来プロアントシアニジン (3量体)	11.5	30

10

【実施例2】

【0038】

実施例2では、実施例1の急性感染系とは異なるSARS-CoV持続感染Verob細胞を用いてブドウ抽出物由来のプロアントシアニジンの効果を評価した。

20

SARS-CoV持続感染Verob細胞は、被検物質を含まない感染細胞を培養し続けることにより得ることが出来る。感染後、3-4日目に生存細胞数が最小となるが、以降生存細胞が再び増殖をはじめ感染後、7-8日目で感染前の細胞数に回復し、ウイルスを産生しながら生存し持続感染細胞となる。このような持続感染細胞に被検物質を添加し、ウイルス増殖阻害活性を上記急性感染の場合と同様に調べた。

【0039】

ウイルスに持続感染系で抗ウイルス作用を示し、感染細胞の生存を助長する抗ウイルス剤は稀であるが、ブドウ由来のプロアントシアニジンはその効果を示した。

〔持続感染細胞を用いた抗ウイルス活性の測定法〕

被検物質として、実施例1で用いた、2~4量体のプロアントシアニジンの混合物(ブドウ由来)を使用した。

30

SARS-CoV感染Verob細胞は持続感染細胞となるが、数代継代後4代目の細胞(2×10^5 個)を6ウエルプレートに培養し、各種濃度の被検物質を加え24時間毎に培養上清を回収し、実施例1と同様の方法でウイルス力価を測定するとともに、24時間毎に顕微鏡観察を行い細胞の成育状態を観察した。また、適宜必要に応じ細胞を回収し実施例1と同様に細胞障害について調べた。

【0040】

〔結果〕

各種濃度の被検物質を添加後、3日目に培養上清、細胞を回収しウイルス力価と生存細胞数を比較した。図2に結果を示す。図中の「cell」は被検物質を各種濃度で添加した場合の生存細胞数(cell number)を示し、「SARS-CoV」は被検物質を各種濃度で含有する培養上清のウイルス力価(PFU)を示す。

40

【0041】

実施例1と同様に高濃度の被検物質(100μ g/ml)ではウイルス増殖は強く阻害されるが、同時に細胞障害も見られた。しかしながら、非常に顕著な結果は 30μ g/ml以下の濃度においてウイルス増殖の阻害と平行して生存細胞の増加が観察された。特に、 30μ g/ml、 10μ g/mlの濃度では細胞数はそれぞれ3.3倍、2.8倍に増加していた。それに反しウイルス増殖は、それぞれ1/60、1/200に阻害されていた。

以上の結果より、ブドウ由来プロアントシアニジンはウイルスの持続感染系においてもウイルス増殖阻害活性を示すことが確認された。さらに、ウイルス増殖を阻害した結果、

50

生存する細胞の増加が観察されたことは、多くの他のウイルス慢性感染系における効果を期待させるものである。

【実施例 3】

【0042】

実施例 1 で得た乾燥粉末状のブドウ抽出物を用いて、抗 S A R S コロナウイルス剤を含有する飲食品、医薬品または化粧品を調整することができる。ブドウ抽出物の代わりに各種重合度のプロアントシアニジンあるいはカテキンを使用しても良い。実施例 3 の飲食品、医薬品または化粧品は、S A R S コロナウイルス感染症の予防用または治療用として摂取することができる。

【0043】

10

<錠剤タイプの内服剤または機能性食品>

ブドウ抽出物 10 mg、乳糖 80 mg、トウモロコシデンブ 8 mg、ステアリン酸マグネシウム 2 mg、以上を 1 錠分として常法により錠剤化する。この錠剤は、内服用の医薬品または機能性食品として使用できる。

【0044】

<乳化液剤タイプ内服剤または機能性食品>

ブドウ抽出物 100 mg、中鎖飽和脂肪酸トリグリセリド 70 mg、ビタミン E 1 mg、オレンジ油 20 mg、デカグリセリンモノステアレート 30 mg、グリセリン 750 mg、ブドウ糖 10 g、クエン酸 1 g、アスコルビン酸 500 mg、以上を水に加えて全量を 100 ml とし、常法により分散乳化処理して、乳化液剤とする。この液剤は、内服用の医薬品または機能性食品として使用できる。

20

【0045】

<硬質カプセルタイプ内服剤または機能性食品>

ブドウ抽出物 10 mg、パレイショデンブ 6 mg、軽質無水ケイ酸 4 mg、ステアリン酸カルシウム 1 mg、乳糖 80 mg、以上を 1 錠分として含むカプセルを常法により得る。

【0046】

<散剤及び顆粒剤タイプの内服剤または機能性食品>

ブドウ抽出物 0.1 g、トウモロコシデンブ 1.1 g、乳糖 0.8 g、以上を一包分とする散剤または顆粒剤を常法に従い調製する。この散剤または顆粒剤は内服剤または機能性食品として使用できる。

30

<注射剤>

ブドウ抽出物 2%、界面活性剤 8%、生理食塩水 90%、以上を重量比で含む混合液を加熱滅菌して注射剤とする。

【0047】

<シリアルタイプ健康志向食品>

ブドウ抽出物 25 g、薄力粉 890 g、グラニュー糖 80 g、炭酸カルシウム 5 g を粉体均一混合後、エクストルーダーを用い常法によりシリアルとする。このシリアルは、継続的摂取が可能な機能性食品として使用できる。

40

【0048】

<キャンディータイプ健康志向食品>

ブドウ抽出物 5 g、砂糖 43 g、水飴 42 g、水 5 g、果汁 2 g、増粘剤 2 g、アスコルビン酸 1 g、香料 0.1 g、ビタミン E 0.1 g を常法に従い、5 g / 個のキャンディーとする。

【0049】

<飲料タイプ健康志向食品>

ブドウ抽出物 15 g、オレンジジュース（果汁 100%）985 g をミキサーにて混合して均一な飲料とする。

【図面の簡単な説明】

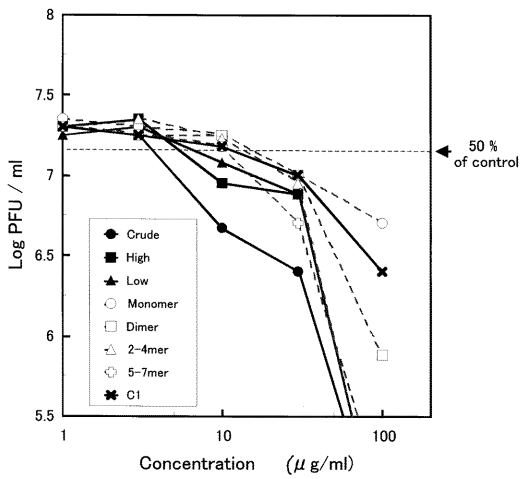
【0050】

50

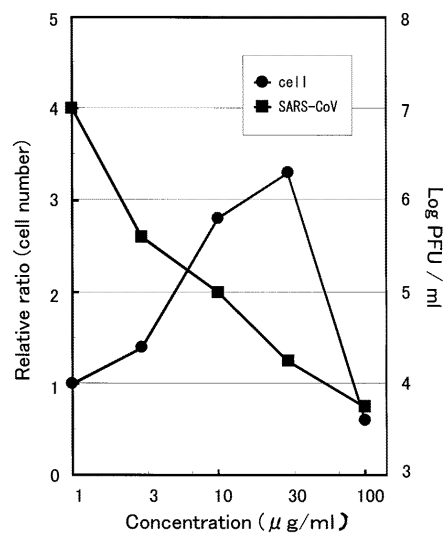
【 図 1 】 実施例 1 に記載した、ブドウ抽出物、プロアントシアニジンおよびカテキンの抗 S A R S コロナウイルス活性を示す。

【 図 2 】 実施例 2 に記載した、S A R S - C o V 持続感染 V e r o 細胞におけるプロアントシアニジンの抗 S A R S コロナウイルス活性を示す。

【 図 1 】



【 図 2 】



 フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 35/78	A 6 1 K 35/78	C
A 6 1 P 31/14	A 6 1 P 31/14	
C 0 7 D 311/62	C 0 7 D 311/62	

(72)発明者 山本 直樹

東京都大田区千束 2 - 1 6 - 5

F ターム(参考) 4B018 MD52 MD60 ME09

4C062 FF44

4C083 AA111 AC841 BB48 CC02 EE13

4C086 AA01 AA02 BA08 MA01 MA04 MA17 MA23 MA28 MA35 MA37

MA41 MA52 MA55 MA63 MA66 ZA89

4C088 AB56 AC04 BA08 CA08 CA14 MA17 MA23 MA28 MA35 MA37

MA41 MA52 MA55 MA63 MA66 NA14 ZA89 ZB33