

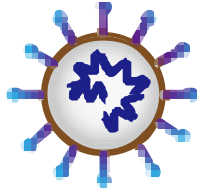
天然物から見つけた 種々の病原ウイルスに対する 不活化物質

帯広畜産大学

グローバルアグロメディシン研究センター

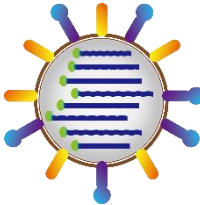
助教 武田 洋平

2021年12月14日



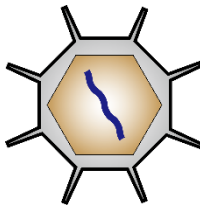
新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 感染症: COVID-19

- ・ 現在、COVID-19パンデミックが続いており、全世界で**約2億5千万人以上**の感染者・**500万人以上**の死亡者



A型インフルエンザウイルス (IAV) 感染症

- ・ 季節性インフルエンザにより年間**30万人以上**が死亡
- ・ 新型株の出現によるパンデミックの懸念



ノロウイルス感染症

- ・ 小児や高齢者で重篤化、**高齢者施設などでの集団感染**が毎年発生
- ・ 有効なワクチン・治療薬は未開発

**安全かつ効果的な新規抗ウイルス化合物の
探索・開発研究に対する社会的要請の高まり**

病原ウイルスの制御対策

- 1) ワクチンによる抗ウイルス免疫の誘導
- 2) 抗ウイルス薬による治療
- 3) ウイルス不活化（殺ウイルス）物質による手指や環境中ウイルスの消毒



**抗ウイルス活性を有する天然由来成分の
ウイルス制御対策への応用の可能性に対する注目の高まり**

- ・ 多彩な生理活性を有する数多くの**天然由来化合物**が発見されている
(抗生剤、抗がん剤、高脂血症治療薬など多種多様な医薬品への応用も)

➤ **天然物から抗ウイルス活性を有する新規シーズを見出せる可能性**

- ・ 既存の抗ウイルス化合物: **人体への有害性や環境汚染性**を示すものも多い

➤ **人体・環境に悪影響を及ぼし難いものも多く、またヒトが食経験を
もつ材料から得られる「天然由来化合物」が代替物となり得る可能性**

ウイルス不活化物質による手指や環境中のウイルスの消毒は重要な感染予防対策のひとつ

SARS-CoV-2やIAVはアルコール消毒薬で容易に不活化される

しかし… ・ COVID-19パンデミックによりアルコール消毒薬不足が発生

また… ・ 長期にわたるアルコール使用による皮膚トラブルの発生

・ アルコールに対し有害応答を示す人たちが一定数存在

ノロウイルスはアルコールに対する抵抗性が高いと考えられ、消毒には次亜塩素酸ナトリウムなどの使用が推奨されている

しかし… ・ 次亜塩素酸ナトリウムは人体への有害性や金属腐食性を持ち取扱いに難あり

→ 既存の消毒薬と同等の有用性を有し、かつ安全性が高く万人が使用可能なウイルス不活化剤は高い需要が期待出来る



ユキノシタ (*Saxifraga stolonifera*)

- ・ 生薬としても利用されており、炎症抑制や肝障害の改善等の目的で使用される
- ・ 食用可



ダイモンジソウ (*Saxifraga fortunei*)

- ・ 利尿等の目的で生薬として使用されることもあり
- ・ 食用可

当研究チームの先行研究により、**モンゴル産ユキノシタ属植物である *Saxifraga spinulosa* 由来抽出エキ스가極めて短時間で各種病原ウイルスを不活化する***ことを論文発表済み (*Takeda et al., *Viruses* 2020.)

本発明において複数の日本産ユキノシタ属植物 (ユキノシタ、ダイモンジソウ、ハルユキノシタ、ジンジソウ、シコタンソウ) 由来エキスおよび縮合型タンニンによる各種病原ウイルスの強力な不活化を達成

日本産ユキノシタから以下の1C画分とタンニン画分を得た (また同様の方法でダイモンジソウ、ハルユキノシタ、ジンジソウ、シコタンソウからも各画分を得た)。



自然乾燥後 acetone-water (4:1) で浸漬抽出。

逆相系樹脂 HP-20 を担体にクロマトグラフィーで分画。

これら画分から
ODS逆相HPLCで
化合物を単離・精製

以下の分画フラクションを得た。

ユキノシタ画分1C (40%MeOH)

ユキノシタ画分1D (60%MeOH)

() 内は溶出溶媒

得られた複数のフラクションの中から、最も
ウイルス不活化活性が高いフラクションとして
ユキノシタ属タンニン (縮合型タンニン) 画分
を特定。

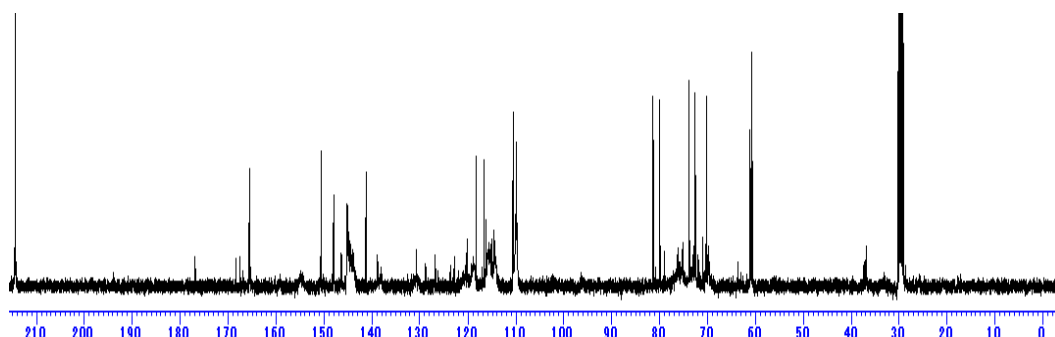


図1. ユキノシタ画分1C ^{13}C -NMR

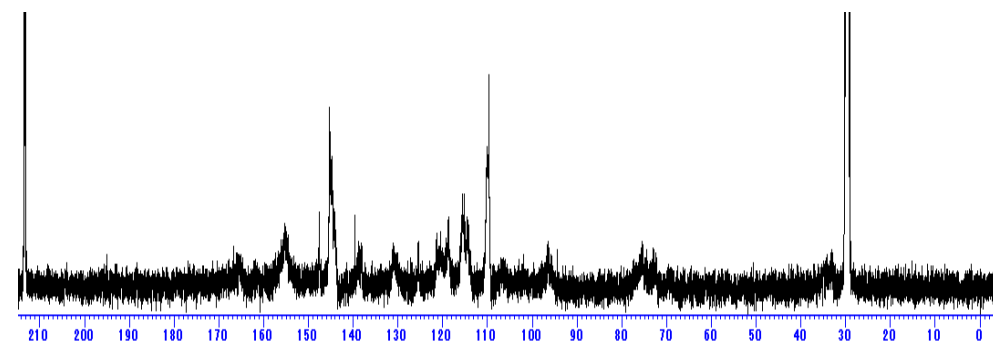
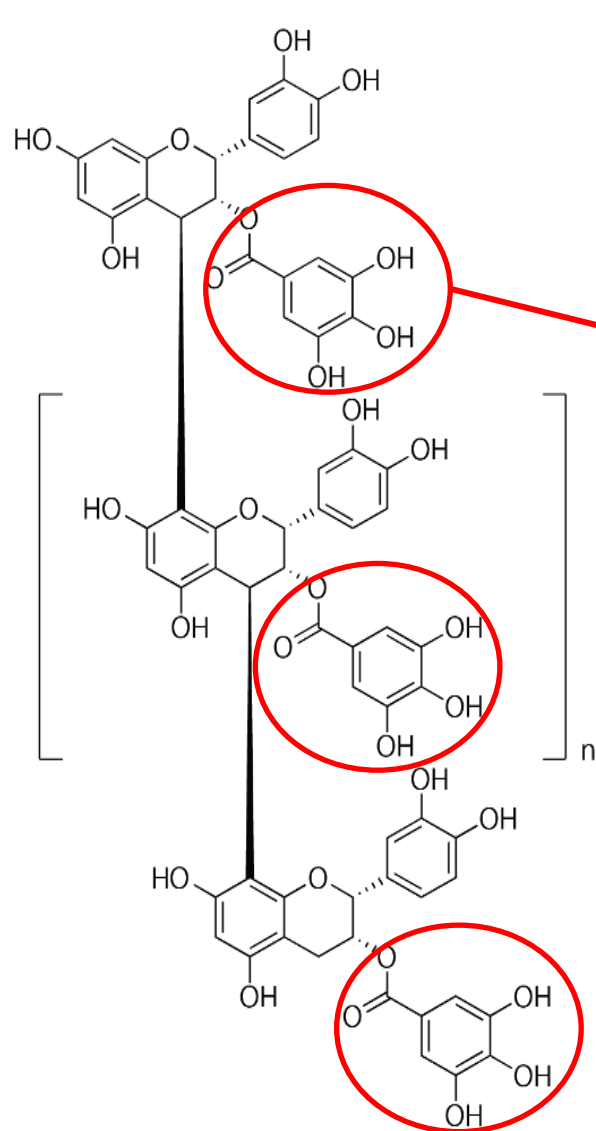
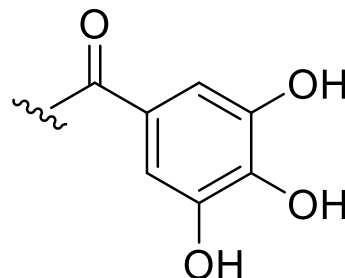


図2. タンニン画分 ^{13}C -NMR

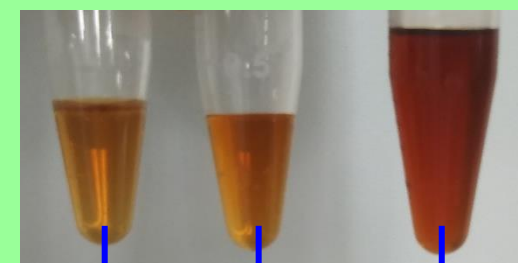
ユキノシタ属由来縮合型タンニンの最大の特徴は**galloyl基が多く結合**しており、アシル化率が極めて高い (90%以上?) ことが挙げられる



ピロガロール構造 [フェノール性水酸基 (-OH) が三つ並ぶ構造] を持つgalloyl (没食子酸) 基を分子内に多く有する特徴をもつ。



各ユキノシタ画分の色



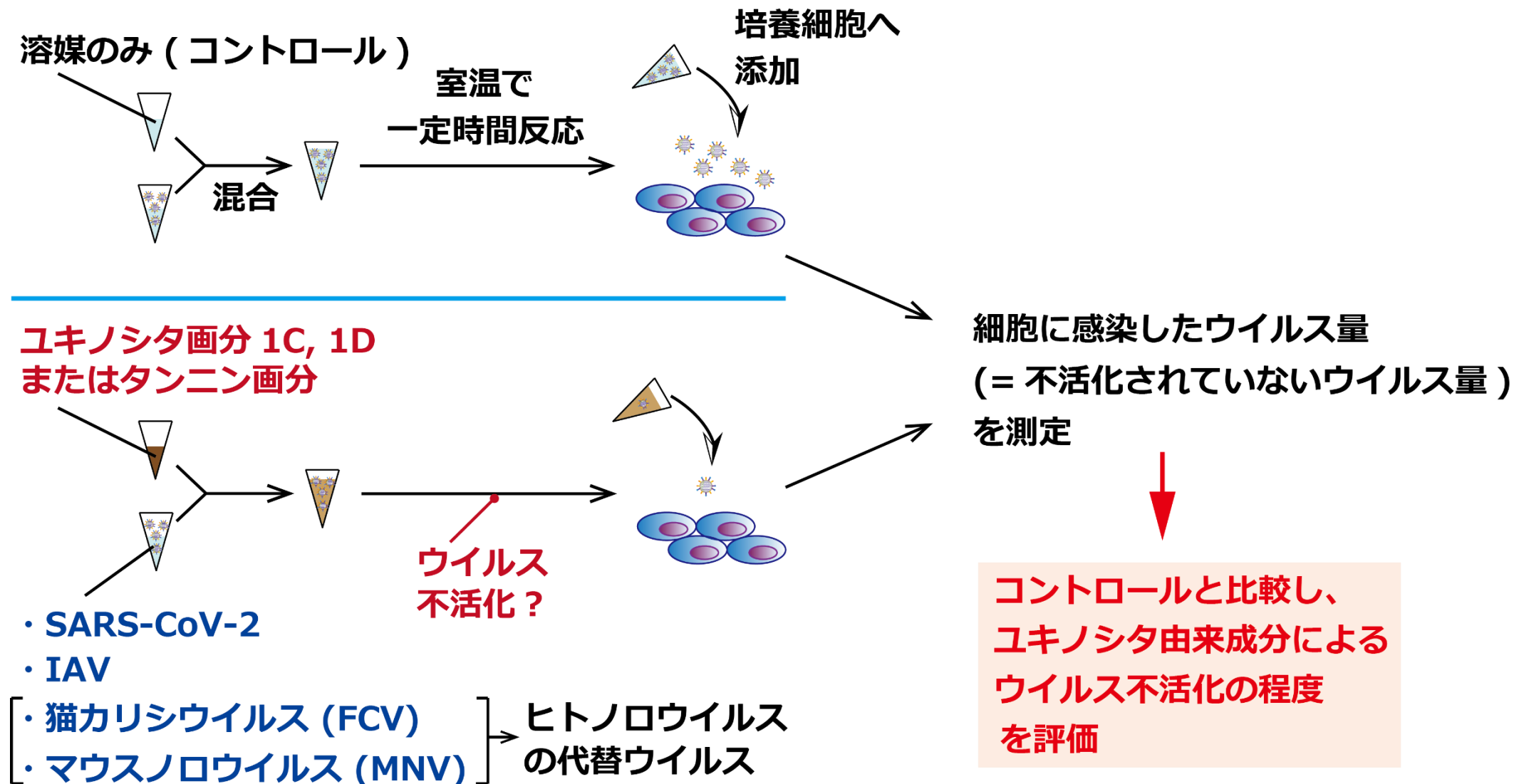
画分1C | タンニン画分
画分1D

注) 5種のユキノシタ属植物いずれからも同様の3種の画分を得た

図3. ユキノシタ属タンニンの推定化学構造

注) 以下の試験を5種のユキノシタ属植物由来画分全てで実施した。

本発表では代表としてユキノシタ (*Saxifraga stolonifera*) 由来画分の結果のみ示す。



表中の数字: 各ユキノシタ画分によるウイルス不活化率

対象ウイルス> SARS-CoV-2

IAV

FCV

MNV

サンプル濃度> 25 µg/ml

25 µg/ml

25 µg/ml

100 µg/ml

反応時間> 10秒

10秒

10秒

1分

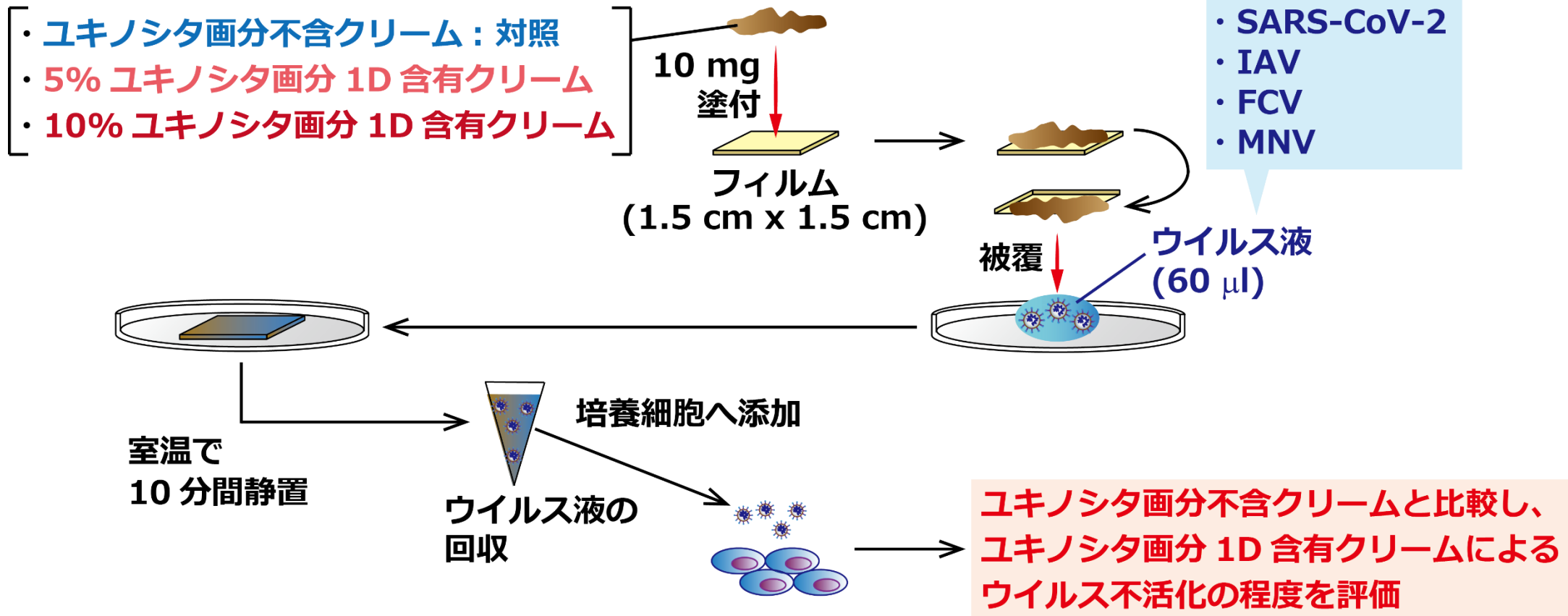
サンプル名				
画分1C	≥99.99%***	≥99.68%**	97.66%**	94.38%*
画分1D	≥99.97**	≥98.98**	98.22**	96.84*
タンニン画分	≥99.93***	≥99.90***	99.68***	98.22**

有意差あり [Student's *t* test (vs. コントロール): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$]

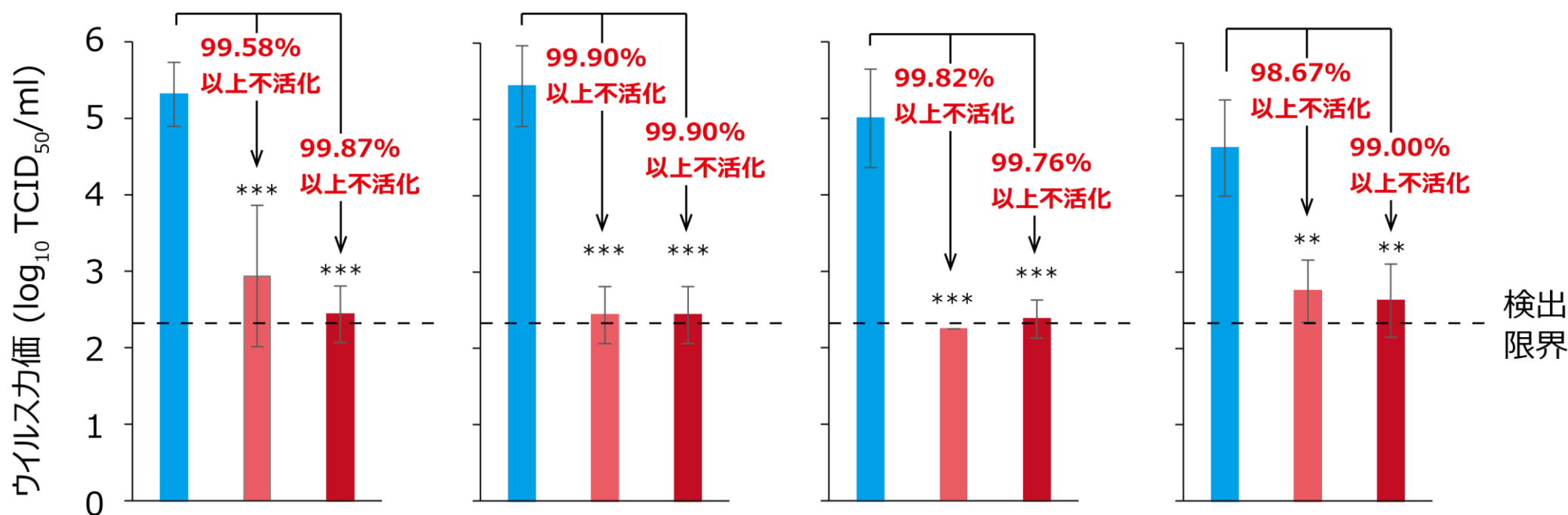
コントロール群のウイルス力価: 3.75 – 5.25 log₁₀ TCID₅₀/ml

各画分は、上記の濃度・反応時間で各種病原ウイルスを少なくとも90%以上、多くの場合99%以上不活化した。

ユキノシタ画分1D含有クリーム ウイルス不活化活性評価方法



- 対照クリーム
- 5% ユキノシタ画分1D含有クリーム
- 10% ユキノシタ画分1D含有クリーム

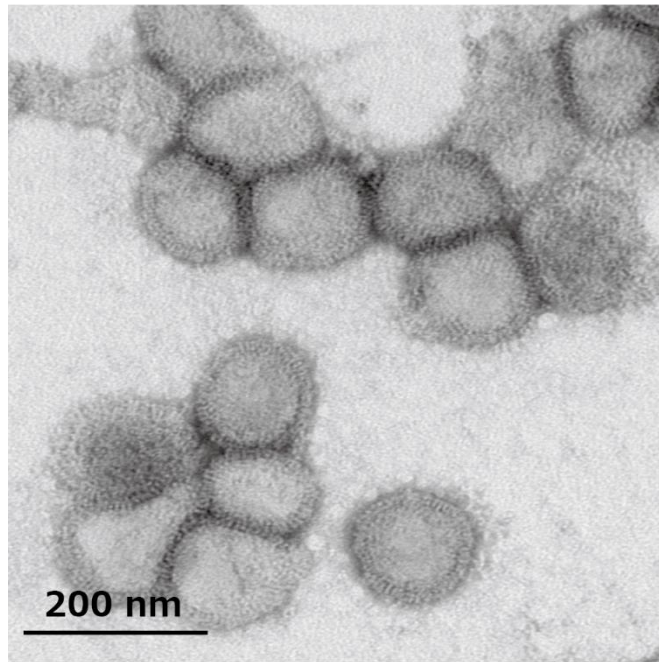
標的ウイルス: SARS-CoV-2IAVFCVMNV統計解析: Student's *t* test (vs. 対照クリーム); ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

5%以上のユキノシタ画分1Dを含有するクリームは10分間の反応時間で各種病原ウイルスを約99%以上不活化した。

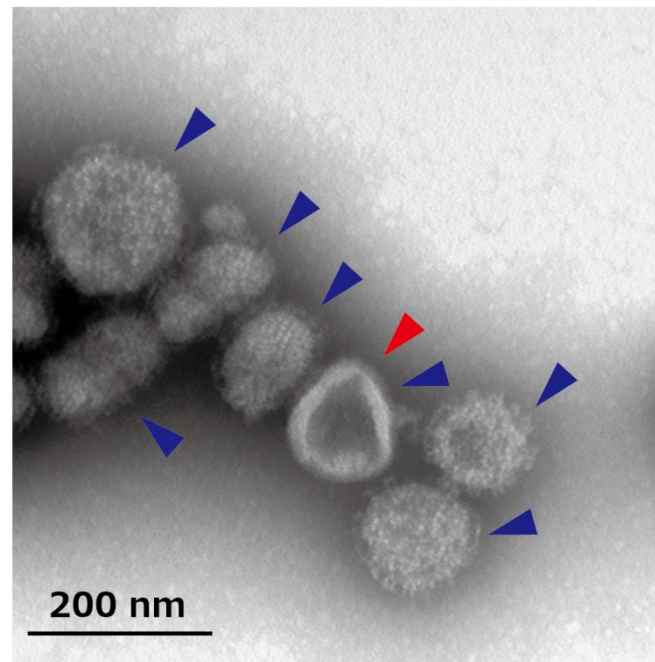
参考) 先行研究の結果: モンゴル産ユキノシタ属 植物由来画分1Cのウイルス不活化メカニズム

電子顕微鏡を用いたIAVのウイルス粒子構造の観察

無処理ウイルス

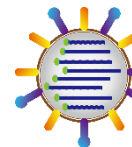


ユキノシタ画分1C処理ウイルス



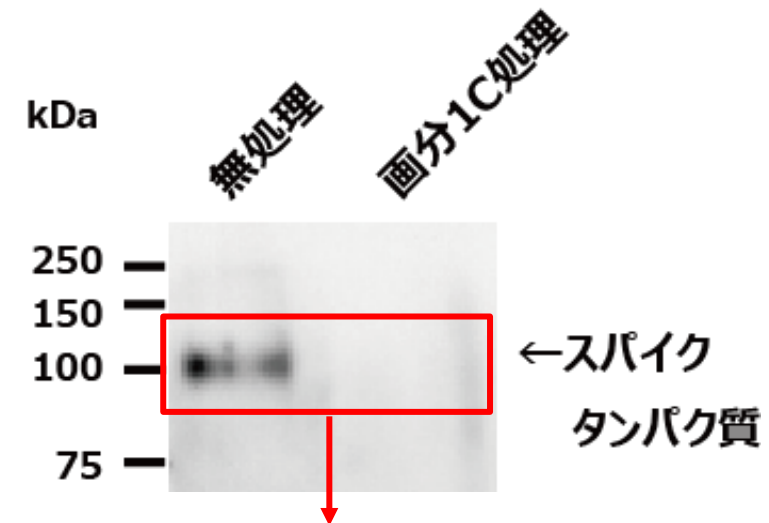
赤矢頭: エンベロープ (膜構造) の破綻?

青矢頭: スパイクタンパク質の粗雑化・消失



スパイク
タンパク質

SARC-CoV-2の スパイクタンパク質への ユキノシタ画分1Cの作用解析 (ウエスタンブロッティング)



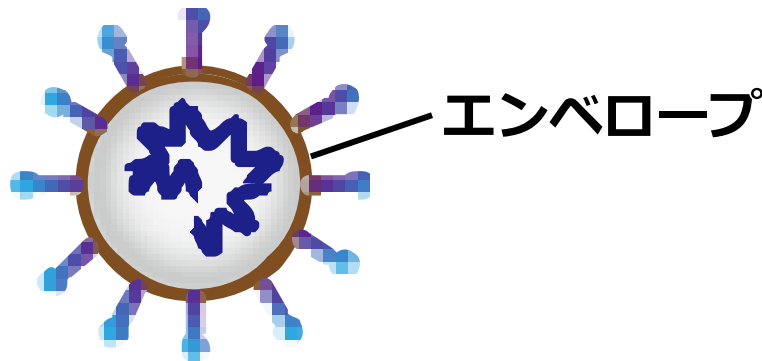
バンドの消失はタンパク質構造が
破壊された可能性を示唆。

モンゴル産ユキノシタ画分1Cはウイルス粒子を構成する
エンベロープ (膜構造) やタンパク質を破壊する作用を有す可能性

(Takeda et al., Viruses 2020.)

ウイルスはその粒子構造の違いにより大きく2種に大別される

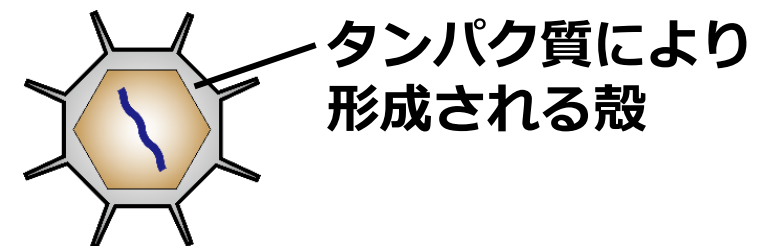
→ **エンベロープ (脂質膜構造) を有するウイルスと有さないウイルス**



エンベロープウイルス

➢ SARS-CoV-2, IAVなど

アルコールを含む多くの消毒薬
により容易に不活化可能



ノンエンベロープウイルス

➢ ノロウイルスなど

アルコールを含む種々の消毒薬に対する
抵抗性が高い (=不活化され難い)

ユキノシタ属由来画分1C, 1D, およびタンニン画分は構造が異なる
2種の病原ウイルスに対し極めて短時間で不活化活性を発揮

→ 既存の消毒薬に対し抵抗性を有するウイルス種を含め、
広範な病原ウイルスの不活化に応用できる可能性

- ・ ユキノシタは食経験もある植物であり漢方として販売・使用されている
- ・ タンニンは多くの食用植物に含まれ安全性も高い化合物と考えられる

→ 手指等の皮膚への適応や経口摂取が可能

- ・ ユキノシタ画分1Cおよび1Dは
活性中心化合物であるタンニン画分と
同程度のウイルス不活化活性を示した

→ 一般的な方法で、かつ比較的少ない製造
ステップにより強力なウイルス不活化活性
を有する画分を作製可能。

また植物体から得られるタンニンの収量は
一般的な低分子化合物よりも多く、もとの
植物素材を活かしやすい。

実施例) 乾燥したユキノシタ全草10 gから

- ・ 画分1C: 282 mg
- ・ 画分1D: 355 mg の収量を得られる



自然乾燥後 acetone-water
(4:1) で浸漬抽出

逆相系樹脂 HP-20 を担体に
クロマトグラフィーで分画

画分1C (40%MeOH)

画分1D (60%MeOH)

本研究で見出したユキノシタ属由来画分は下記の様な
様々な抗ウイルス製品へ応用できる可能性がある。

・ 抗ウイルス性サプリメント



ノロウイルス感染部位である
腸管においてウイルスを直接殺す
補助療法的な応用の可能性？

・ 抗ウイルス性ハンドクリームや
ボディーローション、化粧品など



タンニンは種々の抗菌・抗ウイルス
作用以外にも抗炎症作用を持つ

・ うがい薬やトローチ

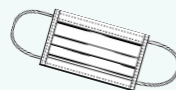


→ 皮膚の炎症抑制作用も期待でき、
外用液剤としての利用は相性が
良い可能性？

・ 天然由来ウイルス消毒薬

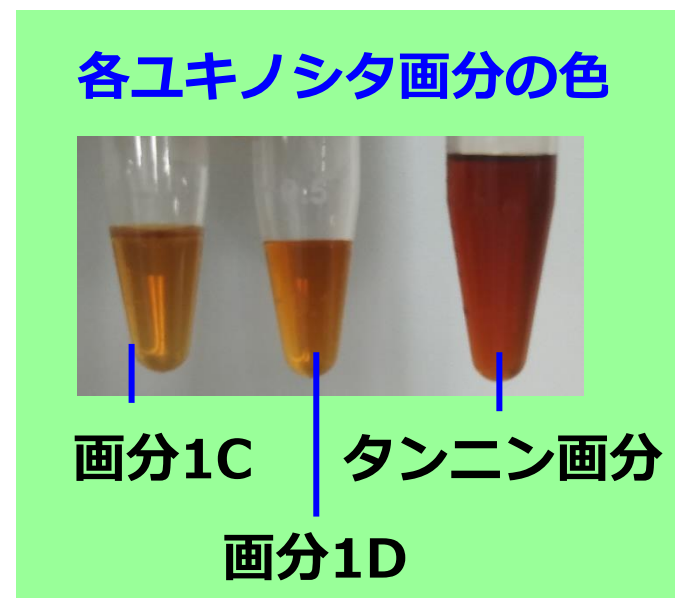


・ マスク等の感染予防製品



アルコール不耐性の人や手荒れが
激しい人も利用可能、また腐食性
や環境汚染性が低いという利点も

- ・原料となる植物の大量かつ安定した確保
(ユキノシタは生薬として生産有り、他の植物も栽培品が出回ることから栽培は可能)
- ・人体への安全性がより高い溶媒の選択や抽出法の検討
(より安全性の高い代替製法の実施が可能)
- ・ウイルス不活化画分の更なる収量増加を可能とする製法の検討
- ・作出した製品の生体に対する安全性評価試験の実施
- ・口に入る様な製品への応用:
一般的にあるとされる「タンニンの渋み」
に対する対処
- ・ウイルス不活化画分の色 (茶褐色) の
影響への対処
(無色とするのは難しく、ある程度の着色が前提となる)



- ・ 原料となる植物の確保
- ・ ウイルス不活化画分の大量生産ラインの確立
- ・ 実際の製品への応用技術を有する企業との
共同研究により、実用性の高い製品の開発の
実現を期待

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：
植物由来抽出物を有効成分とするウイルス
不活化剤
- 出願番号：特願2021-081943
- 出願人：帯広畜産大学、東北医科薬科大学
- 発明者：武田 洋平、村田 敏拓、小川 晴子

産学連携の経歴

2019年発生のコロナ禍以降、SARS-CoV-2の制御を目的とした抗ウイルス性素材や製品の開発研究およびウイルス不活化活性評価試験を国内外の多数の企業と実施 (現在も複数継続中)。

- ニュースリリース等の発表 (4件他)
- 国際学術論文の発表 (5報他)
- 特許出願 (本件を除き他2件)
- 研究助成金の獲得 (3件)

お問い合わせ先

帯広畜産大学

産学連携センター 嘉屋 元博

TEL 0155-49-5829

FAX 0155-49-5775

e-mail chizai@obihiro.ac.jp