

令和 6 年 9 月 24 日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15446

研究課題名（和文）複数の病原ウイルスを不活化する薬用植物の活性中心化合物の同定及び感染制御への応用

研究課題名（英文）Identification of virucidal compounds derived from medicinal plants and these application to infection control against multiple pathogenic viruses

研究代表者

武田 洋平（Takeda, Yohei）

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・准教授

研究者番号：30804447

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）、A型インフルエンザウイルス（IAV）、またヒトノロウイルス代替ウイルスである猫カリシウイルス及びマウスノロウイルスに対し不活化活性を示す天然由来成分としてユキノシタ（*Saxifraga*）属植物由来エキス、およびその活性中心化合物である縮合型タンニンを見出した。また、それらのウイルス不活化における作用機序を解析した結果、当該エキス及び縮合型タンニンがウイルス構造タンパク質と相互作用し、ウイルス粒子を凝集、破壊することが明らかとなった。なお、本研究成果は論文としてまとめ国際学術雑誌にて発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、SARS-CoV-2やIAVは世界的に蔓延しており、また毎年多くの人々がノロウイルス感染症に罹患している。よってこれら病原ウイルスに対する感染制御策の強化は公衆衛生上の重要課題である。本研究で見出した *Saxifraga* 属植物由来エキス及び縮合型タンニンは手指や環境表面の病原ウイルスの不活化に応用可能であり、皮膚傷害性や刺激性、環境汚染性等の問題により既存のウイルス不活化剤が適用できない状況下でも使用できる可能性がある。更には様々な素材への抗ウイルス活性の付与へも応用することが可能と考えられる。これらのことから、本研究で見出した抗ウイルスシーズは感染制御対策の拡充へ寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, *Saxifraga* species-derived extract was identified as a component which has potent virucidal activity against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), influenza A virus (IAV), and human norovirus surrogates (feline calicivirus and murine norovirus). In addition, condensed tannins were identified as active chemical constituents that play a central role in the virucidal activities of this extract. In the analysis of their mechanisms of action in the virus inactivation, it was shown that the extract and condensed tannins interacted with viral structural proteins and aggregated and destructed viruses. The knowledge obtained in this research was published as a research article in international academic journal.

研究分野：ウイルス学

キーワード：天然由来化合物 ウイルス不活化 新型コロナウイルス A型インフルエンザウイルス ノロウイルス

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) や A 型インフルエンザウイルス (IAV)、ノロウイルス (NV) は世界中の人々の健康を脅しており、これら病原体に対する効果的な感染制御対策の構築は喫緊の課題である。この様な公衆衛生上重要な病原ウイルスが蔓延している現状を打開するためのアプローチの一つとして、感染予防や治療へ応用可能な新規抗ウイルス物質の探索研究が注目されている。

新規抗ウイルス化合物のシーズとしては天然由来物、特に抗病原体効果の伝承がある様々な薬用植物由来エキスや化合物の研究が盛んに行われている。天然化合物の構造は人工化合物と比べ多様性に富み薬理作用も多彩なため未知の創薬シーズの発見が期待でき、実際に天然物が起源の既存医薬品も多い。しかしその反面、実際のウイルス制御対策へ応用可能なほど強い活性を有する例は稀で、また抗ウイルス天然物を対象とした研究では限定条件下で一定の有効性を認めるものの、構造活性相関やウイルスに対する作用機序が十分に解明出来ず実用化に至らない例も数多く存在する。この様な事態を回避するためには、構造活性相関に基づく抗ウイルス化合物の探索、作用標的であるウイルス構造部位の特定や作用機序の解析、といったアプローチを総合的に進める必要がある。

申請者らは以前より国内外問わず生薬として民間で用いられてきた多くの薬用植物由来成分の抗ウイルス活性を評価してきた。なかでもモンゴル産のユキノシタ属植物 *Saxifraga spinulosa* より抽出したエキスが SARS-CoV-2 や IAV、更にヒト NV の代替ウイルスである猫カリシウイルス (FCV) やマウス NV (MNV) に対し極めて短時間でウイルス不活化活性を示すことを先行研究で報告した (文献 1)。その後、更に本課題の予備試験を実施し、モンゴル産植物種のみならず複数の日本産 *Saxifraga* 属植物由来エキスにおいても上記 4 種の病原ウイルスに対する不活化活性を確認した。しかしそれらエキス中には多数の化合物が混在しており、ウイルス不活化活性を担う成分の同定やその作用機序の解明は未達成であった。

2. 研究の目的

本研究では複数の *Saxifraga* 属植物由来エキスの強力なウイルス不活化活性を担う活性中心化合物を同定し、その作用機序を明らかにすることを目的とした。更に、それら有効成分について、実社会における環境中のウイルスの不活化への応用を目指した検討も行うこととした。

3. 研究の方法

先行研究では、モンゴル産 *Saxifraga spinulosa* 由来粗抽出液より極性の違いによって 6 種のエキスを分画し、各エキスのウイルス不活化活性を評価した。その結果、6 種類のエキスのうち、ピロガロール構造を有する化合物群を豊富に含むエキスにおいて最も強いウイルス不活化活性が認められた。そこでまず、本研究で対象とした複数の日本産 *Saxifraga* 属植物においても先行研究と同様の方法でピロガロールリッチエキスを抽出し、SARS-CoV-2、IAV、FCV、MNV に対しウイルス不活化活性を示すか否かを評価した。更に、それらピロガロールリッチエキス中に含まれる個々の化合物を単離した。その後、各単離化合物の上記 4 種の病原ウイルスに対する不活化活性を比較し、最も強い活性が認められた化合物、即ち活性中心化合物の同定を試みた。続いて、同定した活性中心化合物のウイルス不活化機序を解析した。即ち、ウイルスを化合物で処理した後、ウイルス構造タンパク質における構造異常や破壊の有無をウエスタンブロッティング法で解析した。また、透過型電子顕微鏡を用いて化合物処理したウイルス粒子構造を直接観察した。また、活性中心化合物を含有するピロガロールリッチエキスについて、実社会におけるウイルス不活化への応用を想定した実験を実施した。即ち、抗ウイルス性を付与したハンドクリーム等への応用を想定し、ピロガロールリッチエキスを含有するクリームを作出しウイルスと接触させることでウイルス不活化活性が発揮されるか否かを解析した。

4. 研究成果

[*Saxifraga* 属植物由来エキスのウイルス不活化活性を担う活性中心化合物の同定]

まず、複数の日本産 *Saxifraga* 属植物より抽出したピロガロールリッチエキスの SARS-CoV-2、IAV、FCV、NMV に対するウイルス不活化活性を評価した。その結果、植物種によって活性の強さに違いがあったが、殆ど全ての植物種由来エキスが 4 種の病原ウイルスに対して不活化活性を示した。中でも *Saxifraga stolonifera* (和名: ユキノシタ) 由来のエキスはとりわけ強いウイルス不活化活性を示し、SARS-CoV-2、IAV、FCV に対しては、25 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で反応時間 10 秒において少なくとも 95%以上のウイルスの不活化を、また MNV に対しては、100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で反応時間 1 分において 90%以上の不活化を引き起こした。そこで、上記ユキノシタのピロガロールリッチエキスから複数の化合物の単離を行い、それら各単離化合物についてウイルス不活化活性を評価したところ、ピロガロールリッチエキスと同等の強力なウイルス不活化活性を有する活性中心化合物を見出した。その活性中心化合物の構造を解析したところ、エピカテキング

レートの基本構成単位とする重合体である縮合型タンニンであると判明した。以後、これをユキノシタタンニンと呼称する。

[ユキノシタタンニンのウイルス不活化作用機序解析の結果]

ユキノシタタンニンのウイルス構造タンパク質への影響を、ウエスタンブロッティング法で解析した。SARS-CoV-2、IAV、MNV の3種のウイルスを対象とし、ユキノシタタンニン処理したウイルスと非処理ウイルスにおけるウイルス構造タンパク質のバンドの発現パターンを比較したところ、非処理ウイルスでは明確な標的タンパク質のバンドが検出されたのに対し、ユキノシタタンニン処理したウイルスではそれらバンドの発現強度の減弱や消失が認められた。この結果は、ユキノシタタンニンが標的ウイルスタンパク質のエピトープ領域に吸着し、エピトープと特異的抗体との反応を阻害している、あるいはエピトープ領域の構造を破壊している可能性を示唆している。

続いて、ユキノシタタンニン処理を受けたウイルス、および比較対象の非処理ウイルスの粒子構造を直接電子顕微鏡で観察した。この時、SARS-CoV-2の代替ウイルスである牛コロナウイルス（安全性の問題から代替ウイルスを使用）、およびIAV、MNVの3種類のウイルス粒子を観察した。その結果、非処理の牛コロナウイルスおよびIAVについては明瞭なエンベロップおよびスパイクタンパク質構造を有するウイルス粒子が、また非処理のMNVでは明瞭なカプシド構造を有するウイルス粒子が多数散在する像が観察された。一方、ユキノシタタンニン処理したウイルスでは、これらエンベロップ、スパイクタンパク質、カプシド構造が破綻した異常粒子が多数凝集している像が観察された。

以上の結果より、ユキノシタタンニンはエンベロップやウイルス構造タンパク質に作用しウイルス粒子構造を破綻させ、更にこれら異常粒子を凝集させることで短時間で強力なウイルス不活化活性を発揮する可能性が示された（下図）。

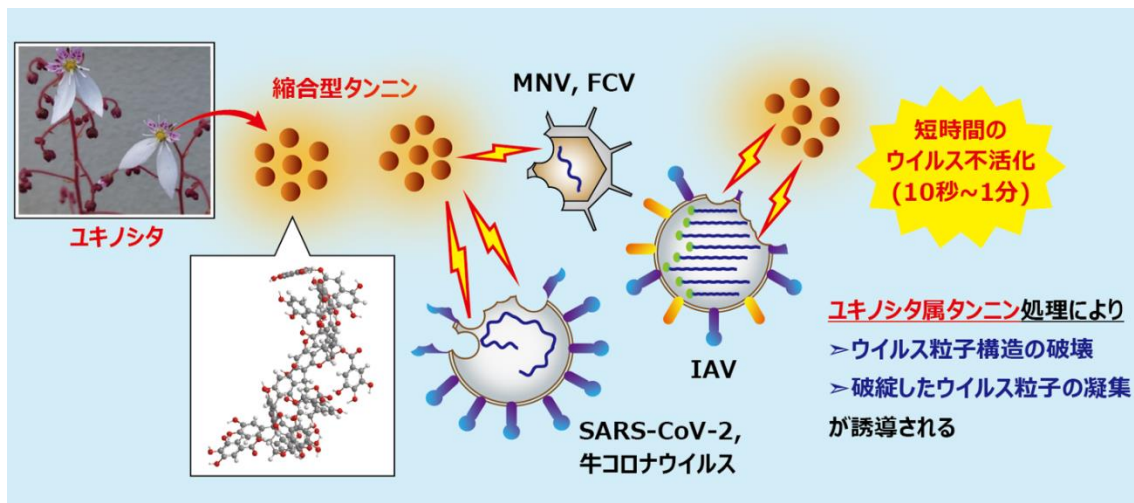


図 ユキノシタタンニン（縮合型タンニン）のウイルス不活化作用機序

[ピロガロールリッチエキス含有クリームでのウイルス不活化活性評価結果の結果]

ユキノシタタンニンを豊富に含む *Saxifraga stolonifera* 由来ピロガロールリッチエキスを含むクリームを、それぞれ SARS-CoV-2、IAV、FCV、MNV の4種類のウイルスを含む液と10分間接触させた。その際、比較対象であるエキス非含有クリームと比較し、エキス含有クリームによるウイルス不活化率を算出した。その結果、エキス含有クリーム処理により、SARS-CoV-2、IAV、FCV、MNV においてそれぞれ 99.5%以上、99.90%以上、99.82%以上、98.67%以上のウイルスの不活化が認められた。

以上、本研究により短時間で強力なウイルス不活化活性を発揮する新規天然由来化合物としてユキノシタ属植物由来縮合型タンニンを見出すことが出来た。また、実社会におけるウイルス制御対策への応用例として、液剤としての使用のみならず、抗ウイルス性クリームとしての利用の可能性を示すことが出来た。これら成果は、下記の文献2として国際学術雑誌へ発表した。

<文献>

1. Takeda Y, Murata T, Jamsransuren D, Suganuma K, Kazami Y, Batkhui J, Badral D, Ogawa H. *Saxifraga spinulosa*-derived components rapidly inactivate multiple viruses including SARS-CoV-2. *Viruses*, 12(7), 699, 2020.
2. Murata T, Jamsransuren D, Matsuda S, Ogawa H, Takeda Y. Rapid virucidal activity of Japanese *Saxifraga* species-derived condensed tannins against SARS-CoV-2, influenza A virus, and human norovirus surrogate viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(6), e0023723, 2023.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Murata Toshihiro, Jamsransuren Dulamjav, Matsuda Sachiko, Ogawa Haruko, Takeda Yohei	4. 巻 89
2. 論文標題 Rapid Virucidal Activity of Japanese Saxifraga Species-Derived Condensed Tannins against SARS-CoV-2, Influenza A Virus, and Human Norovirus Surrogate Viruses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e00237-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/aem.00237-23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yohei Takeda
2. 発表標題 Analysis of various virucidal substances against multiple pathogenic viruses
3. 学会等名 Asian Association of Veterinary Schools meeting 2022（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武田洋平、村田敏拓、小川晴子
2. 発表標題 ユキノシタ (<i>Saxifraga stolonifera</i>) 由来縮合型タンニンの複数の病原ウイルス種に対する不活化活性
3. 学会等名 第165回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yohei Takeda, Toshihiro Murata, Haruko Ogawa
2. 発表標題 Virucidal activity of Japanese Saxifraga species-derived condensed tannins against multiple pathogenic viruses
3. 学会等名 第55回 ウイルス学会北海道支部シンポジウム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 植物由来抽出物を有効成分とするウイルス不活化剤	発明者 武田洋平、村田敏 拓、小川晴子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-078447	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協 力者	村田 敏拓 (Murata Toshihiro) (70458214)	東北医科薬科大学・薬学部・准教授 (31305)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------