

## 植物バイオマス由来抗ウイルス活性物質の探索\*

成田 亮\*\*·\*\*\*, 李 瑞波\*\*\*\*

### Antiviral compounds from plant biomass\*

Ryo Narita\*\*·\*\*\* and Ruibo Li\*\*\*\*

#### 概要

地球温暖化などによる環境変動や、グローバル化による人・動物・物の移動が増加したことから、近年ウイルスをはじめとした感染症のリスクが高まっている。本稿では、再生可能な持続資源として注目を集めている木質バイオマスの中で、木竹酢液の生理活性に着目した研究成果を紹介する。木竹酢液は、木竹炭を製造する際に副次的に得られ、セルロース、ヘミセルロースおよびリグニンの熱分解生成物などから構成される。木竹酢液は古くから消毒、殺菌などに使用されており、様々な生理活性を有するバイオマスであるが、ウイルスなどの病原体に対する活性についての検討は十分ではない。そこで、未利用バイオマスから薬効成分・生理活性物質を生産し、人の健康や安全な生活に貢献するという新しい研究領域を開拓することを目的として著者らが最近行っている、木酢液、竹酢液の抗ウイルス活性についての成果も併せて紹介する。とりわけ、2010年に宮崎県で発生した家畜伝染病、口蹄疫の原因ウイルスである口蹄疫ウイルスなどに対する消毒薬への応用を視野に入れ、木竹酢液に含まれる抗ウイルス活性物質の探索を行った結果について詳述する。これまでに、口蹄疫ウイルスと同じピコルナウイルス科に属する脳心筋炎ウイルスを用いて木竹酢液の抗ウイルス活性の検討を行い、木竹酢液は酸性条件下で強い抗ウイルス活性を示すことが明らかになっている。また、木竹酢液に含まれる phenol と酢酸が相乗的に抗ウイルス活性を示すことを示した。われわれの実験結果では、ヒノキ由来の木酢液原液が中性条件下においても抗ウイルス活性を示したことから、この画分に含まれる抗ウイルス活性物質の探索を行った。成分分画と抗ウイルス活性の検討により、精製したフラクションに抗ウイルス活性物質が含まれることを示した。本稿では、研究課題に関連する今後の展望についても簡単に言及する。

#### 1. はじめに

全世界の人口が 70 億人を超えた現在では、限りある化石燃料などの枯渇性資源依存型社会から、再生可能エネルギー依存型社会へ遷移し、環境に配慮した生産活動を営むすべを開発、発展させることは、人類のみならず地球上のあらゆる生物種の存続にきわめて重要である。近年、植物資源、特に木質バイオマスが再生可能な持続資源として注目されている。木酢液、竹酢液はバイオマスの熱分解物であり、これまでに消毒や土壌改良剤、皮膚疾患への薬効や抗菌性が一部認められているが科学的な検証は十分ではない。本稿では、木竹酢液とその生理活性について解説し、著者らが行っている木竹酢液の抗ウイルス活性(図 1)についての結果を紹介する。

\* 2015年7月31日作成

\*\* 〒611-0011 宇治市五ヶ庄 京都大学生存圏研究所学際萌芽研究センター。

\*\*\* 〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 53 京都大学ウイルス研究所分子遺伝学研究分野

E-mail: rnarita@virus.kyoto-u.ac.jp.

\*\*\*\* 〒611-0011 宇治市五ヶ庄 京都大学生存圏研究所バイオマス変換分野。

## 2. 木竹酢液とその生理活性

### 2.1 木竹酢液とは

木竹酢液の基となる粗木竹酢液は、広葉樹や針葉樹、タケ類などの木竹材を炭化炉や乾溜炉により炭化する際に生じる排煙を冷却・凝縮後 90 日以上静置し、三層に分離した上層の軽質油ならびに下層の沈降タールを除いた中間層の液体である(図 2; 日本木酢液協会 HP より引用)。これには、木竹材を構成する主要三成分であるセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンの熱分解生成物が溶け込んでおり、酢酸を主とする有機酸類、アルコール類、エーテル類、アルデヒド類、ケトン類、フェノール類、アミン類、スルホン類ならびにその他の中性成分等、200 種類以上が含まれる<sup>1,2)</sup>。

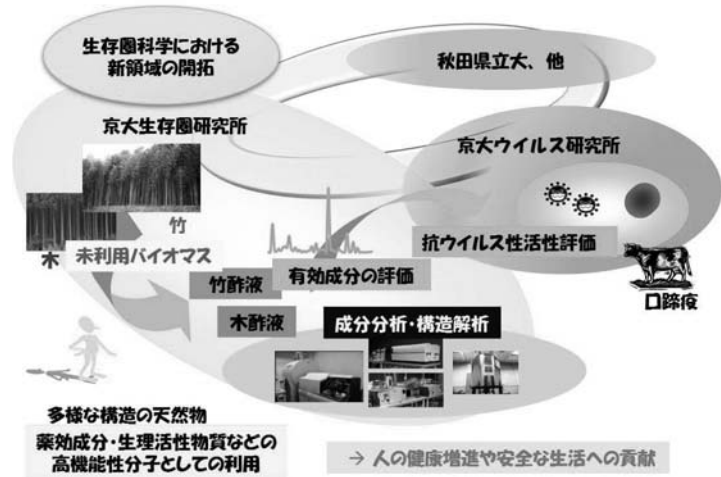


図 1: 本研究の概要図

### 2.2 木竹酢液の生理活性

木炭を作る過程で出てくる木酢液については古くから研究されており、農業や医薬部外品など多方面で利用されてきた。木竹酢液の生理活性としては、抗菌性、抗酸化性などが報告されている。フタバナヒルギ由来木酢液はカンジダアルピカンスに対する強い抗菌性を示し、コナラやアカマツ由来木酢液は中性条件下においても子囊菌類のオフィオストマポロニクムの増殖を抑制することが示されている<sup>3,4)</sup>。チョウセンゴミシ由来木酢液のジクロロメタン抽出液は、抗酸化剤として用いられているジブチルヒドロキシトルエンよりも強い抗酸化作用を示す<sup>5)</sup>。クルミ由来木酢液においては、含有 phenol 量が多いほど抗酸化作用が強くなることが報告されている<sup>6)</sup>。また、殺虫剤や殺蟻剤としても用いられており、コナラやアカマツ由来木酢液がヤマトシロアリに有効であることが知られている<sup>7)</sup>。中でも、*o*-cresol や 2-methoxy-4-ethylphenol などのフェノール類が強い殺蟻活性を示すことが報告されている。木竹酢液は、その持つ独特の燻香のため消臭剤としても優れており、トイレ、畜舎等の悪臭駆除に使用されている。また、木竹酢液が免疫応答において機能していることも明らかとなっており、孟宗竹由来竹酢液に含まれる *cresol* が、活性酸素の産生とプロテインキナーゼ C- $\alpha/\delta$  の活性化を抑制することでインフラマソームの活性化を阻害し、抗炎症作用を示すことが報告されている<sup>8)</sup>。さらに、クヌギ由来木酢液は、signal transducer and activator of transcription 3 のリン酸化を抑制することにより抗炎症作用を示し、皮膚炎に効果があることが明らかとなっている<sup>9)</sup>。木酢液は I 型アレルギーに効果があることも知られている<sup>10)</sup>。

このように、木竹酢液の確かな効能は認められてきたものの、品質の不安定性、燃料革命による炭需要の減少、農業や化学肥料の出現により木竹酢液はあまり注目されなかった。しかしながら、環境に配慮した生産活動が求められる現在、バイオマス資源より生産される木竹酢液の有効性は再認識されるべきであろう。そこで本研究では、木竹酢液の有する抗ウイルス活性ならびに動物の免疫反応における効果に着目し、木竹酢液がウイルス感染症予防に活用できるのではないかと考え、研究を実施した<sup>11)</sup>。

### 3. 木竹酢液の抗ウイルス活性

#### 3.1 口蹄疫ウイルスのモデルウイルスとしての脳心筋炎ウイルス

ピコルナウイルスは小さい(pico)、RNA (rna)型のウイルス(virus)という意味であり、形態的に最も小さい部類のウイルス群である。そのウイルスゲノムはプラス鎖の1本鎖RNAで、長さは約7.1-8.9kbである。構造的にはほぼ球形の正20面体対称で、精製されたウイルス粒子の直径は約30nmである。ウイルスカプシドは構造タンパク質であるVP1, VP2, VP3, VP4によって構成されている。ピコルナウイルス科はエンテロウイルス属、ライノウイルス属、アフトウイルス属、カルジオウイルス属などから構成され、ポリオの原因ウイルスであるポリオウイルスや、風邪の原因ウイルスの一つであるヒトライノウイルスなどが存在する<sup>12)</sup>。

2010年、家畜伝染病である口蹄疫が宮崎県で発生し、29万頭の牛や豚が殺処分された。口蹄疫は、ピコルナウイルス科アフトウイルス属の口蹄疫ウイルス (foot-and-mouth disease virus; FMDV) による感染症である。FMDV感染による致死率は低いものの、その高い伝播性や罹った動物の生産性減少のため、患畜は全て速やかに殺処分される<sup>13)</sup>。したがって、FMDV感染においては予防対策が重要であることに疑いの余地はない。しかし現時点で、環境および家畜に害を及ぼさないFMDV予防対策は確立されていない。木竹酢液は環境への悪影響は少ないと考えられ、さらに、その人畜等に対する安全性も評価されている。FMDVはpH7以下において不安定であるため、酸性の木竹酢液処理によりウイルスは感染力を喪失することが容易に予想できる。したがって、木竹酢液はFMDV消毒薬の候補となりうるが、木竹酢液の酸以外の複合的な成分が直接ウイルスに作用、または細胞に作用することで抗ウイルス効果を発揮する可能性も十分に考えられる。しかしながら、上述したように、FMDVはpH高感受性であるため、酸以外の抗ウイルス化合物探索には適さない。一方、脳心筋炎ウイルス (Encephalomyocarditis virus; EMCV)はFMDVと同じピコルナウイルス科でありながらpH3~9にて安定であり、マウス細胞やヒト細胞だけでなく、マウス個体を用いた感染実験にも使用できる。すなわち、EMCVを用いることで、木竹酢液の酸以外の抗ウイルス効果の機能性スクリーニングも可能となるだけでなく、広汎なリソースである植物成分の新たな抗ウイルス因子のスクリーニングと、それらの分子レベルでの機能解析が可能となる。そこで本研究では、EMCVをFMDVのモデルウイルスとして使用し、表1に示す木竹酢液のもつ潜在的な抗ウイルス作用を検討した。

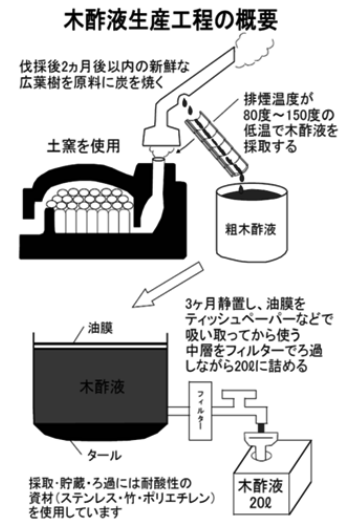


図2: 木酢液生産工程の概要

表 1: 本研究に使用した木竹酢液

No.	試料名	種別	樹種	産地	pH
A	白炭木酢液	常緑広葉樹	ウバメガシ	和歌山	2.3
Ad	蒸留白炭木酢液	常緑広葉樹	ウバメガシ	和歌山	2.1
B	黒炭木酢液	落葉広葉樹	ミズナラ	岩手	2.9
Bd	蒸留黒炭木酢液	落葉広葉樹	ミズナラ	岩手	2.7
C	竹酢液	竹	孟宗竹	山梨	3.5
Cd	蒸留竹酢液	竹	孟宗竹	山梨	2.5
D	アカマツ木酢液	針葉樹	アカマツ	秋田	3.7
Dd	蒸留アカマツ木酢液	針葉樹	アカマツ	秋田	2.7
E	ヒノキ木酢液	針葉樹	ヒノキ	岐阜	2.8
F	カラマツ木酢液	針葉樹	カラマツ	北海道	3.5

### 3.2 木酢液の抗ウイルス活性

木竹酢液は材料、産地および製造法の違いによりその組成が異なる(表 1)。木竹酢液と混合して 1 時間反応させた EMCV の感染性が低下するか否かを検討したところ、6 種の木竹酢液原液 (A、Ad、B、Bd、C、Cd) は EMCV に対して抗ウイルス活性を有しており、それらは特に酸性条件下で有効であることを明らかにしてきた。蒸留竹酢液 Cd に関して詳細な抗ウイルス活性について検討したところ、抗ウイルス活性物質の一つとして phenol が大きく関与していることを見出した。また、phenol 単独の抗ウイルス活性が、活性粗分画部の活性より低い活性を示したことから、phenol とその他の物質が混合することにより、相乗的に抗ウイルス活性を高めていることを示した。また、活性粗分画部、非活性粗分画部および phenol にそれぞれ単独では影響のない濃度の酢酸 (2.7% 終濃度) を添加することで抗ウイルス活性が大きく高まった<sup>14)</sup>。

さらに、ヒノキならびにカラマツ由来の木酢液(E および F)は、孟宗竹由来の竹酢液とは異なる活性物質を含有する可能性を示してきた。そこで、ヒノキ木酢液 E のウイルス不活化物質を探索するため、図 3 に示すようにヒノキ木酢液 E の成分分画を行い、分画部 E-Fr.1-1~3、E-Fr.1-2-1~3 および E-Fr.1-3-1~3 をそれぞれ得た。これら分画部のウイルス不活化活性について検討した結果を図 5 に示す。E-Fr.1-1-1、E-Fr.1-2-1、E-Fr.1-2-2 および E-Fr.1-3-1 は EMCV の感染性を 1/10 以下に低下させたが、E-Fr.1-1-2 にはウイルス不活化活性が確認できなかった。このうち、最も強い抗ウイルス活性を示した E-Fr.1-1-1 の成分分画を行い、E-Fr.1-1-1-1~4 を得た。これら分画部の抗ウイルス活性を同様に測定したところ、E-Fr.1-1-1-1~3 で強い抗ウイルス活性を示すことが明らかとなった(図 6)。そこで EMCV に対する抗ウイルス活性の確認できた分画に含まれる化合物を GC-MS によって解析し、抗ウイルス活性物質の候補となる化合物を数種得た。現在これら化合物の抗ウイルス活性を検討しているところである。

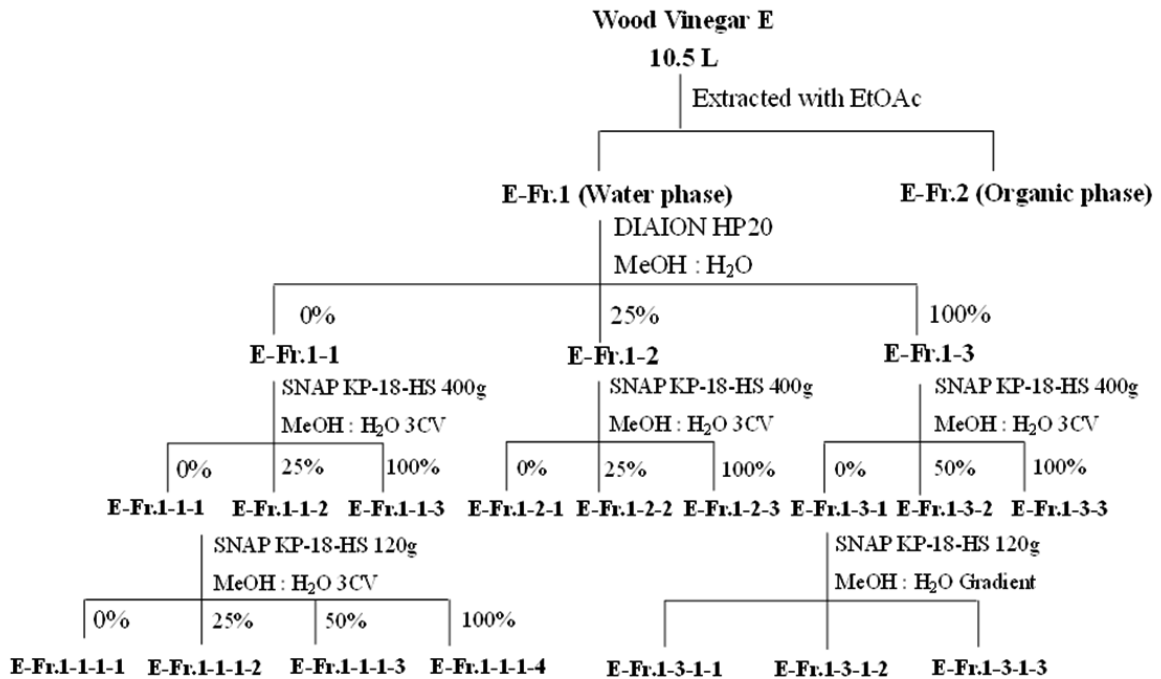


図 3: ヒノキ木酢液 E の成分分画

#### 4. まとめと今後の展望

これまでに、蒸留竹酢液Cdの詳細な抗ウイルス活性を検討し、抗ウイルス活性物質の一つとしてphenolが大きく関与していることを見出すとともに、phenolは酢酸と相乗効果を示し、強い抗ウイルス活性を示した<sup>10)</sup>。Phenolと酢酸がどのようにして強い抗ウイルス活性を示しているかは明らかとなっていないが、EMCVのウイルス粒子の構造を変化させることにより不活化活性を示している可能性が示唆されている。

本研究では、ヒノキ由来の木酢液原液 (E) はEMCVに対して抗ウイルス活性を有し、中性条件下でも活性を保持することから、この画分に含まれる活性物質の探索を行った。成分分画と抗ウイルス活性の検討により、精製したフラクションに抗ウイルス活性物質が含まれることを示した。現在これら化合物の抗ウイルス活性の検討を行っている。また、木竹酢液の成分分析を行ったところ、phenolだけでなく、その類似体も多く含まれていることが明らかとなった。そこで今後はこれら木竹酢液に含まれるphenol類似体の抗ウイルス活性を検討していく予定である。さらに、インフルエンザウイルス(オルトミクソウイルス科)や、FMDVと同程度のpH感受性を示すヒトライノウイルス(ピコルナウイルス科)などのウイルスを用い、木竹酢液に含まれる抗ウイルス活性物質の同定を進める予定である。

木竹酢液は様々な生理活性を示すことが明らかとなっているが、200種類以上の成分から構成されること、産地や製法によってその組成が異なることなどから、木竹酢液に含まれるどの成分が生理活性を示すのか、あまり解析は進ん

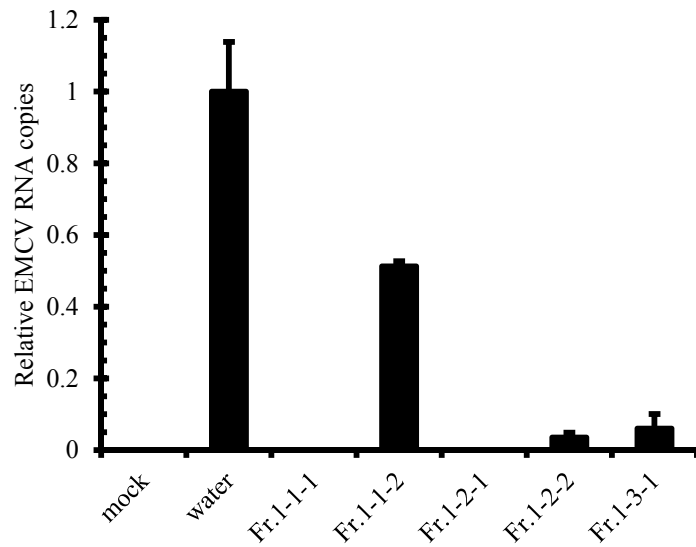


図 4: E-Fr.1-1-1~2, 1-2-1~2, 1-3-1 の抗ウイルス活性

EMCV をそれぞれのヒノキ由来木酢液 E 分画部と混合し、氷上で1時間反応後、L929細胞に感染させた。感染後6時間で細胞からRNAを回収し、逆転写後、EMCV特異的プライマーならびにSYBR Greenを用いた定量的RT-PCRにより細胞中の相対的ウイルスRNA量を算出した。

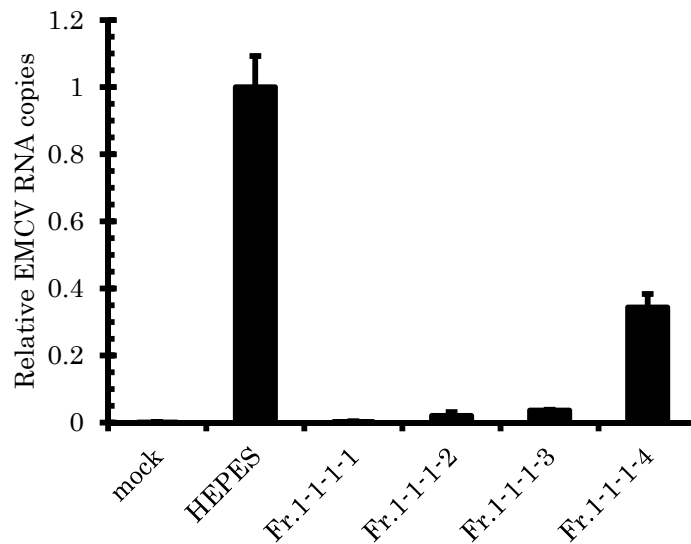


図 5: E-Fr.1-1-1-1~4 の抗ウイルス活性

上記ヒノキ由来木酢液 E 分画部を用い、前述の方法と同様にEMCV不活化実験を行った。

でない。今後、木竹酢液に含まれる生理活性物質の同定が進むことにより、抗ウイルス薬や炎症性疾患の治療薬として応用されることが期待される。

## 参考文献

- 1) 谷田貝光克, 雲林院源治, 大平辰朗, 炭化副産物に関する研究(第4報)木酢液の成分, 木材学会誌, 34, 184-188, 1988.
- 2) Mathew S, Zakaria ZA., Appl. Microbiol. Biotechnol., 99 (2), 611-622, 2015.
- 3) Darah I, Jain K, Lim SH and Wendy R., J. App. Pharm. Sci., 3 (07), 007-013, 2013.
- 4) Velmurugan N, Han SS, Lee YS., Int. J. Environ. Res., 3, 167-176, 2009.
- 5) Ma C, Li W, Zu Y, Yang L, Li J., Molecules, 19 (12), 20821-20838, 2014.
- 6) Wei Q, Ma X, Zhao Z, Zhang S, Liu S., J. Anal. Appl. Pyrolysis, 88, 149-154, 2010.
- 7) Yatagai M, Nishimoto M, Hori K, Ohira T, Shibata A., J. Wood Sci., 48:338-342, 2002.
- 8) Ho CL, Lin CY, Ka SM, Chen A, Tasi YL, Liu ML, Chiu YC, Hua KF., PLoS One, 8 (10), e75738, 2013.
- 9) Lee CS, Yi EH, Kim HR, Huh SR, Sung SH, Chung MH, Ye SK., J. Ethnopharmacol., 135 (3), 747-753, 2011.
- 10) Imamura E, Watanabe Y., U.S. Patent, 0136133A1, 2005.
- 11) 山元誠司, 丸本真輔, 西村裕志, 尾野本浩司, 谷田貝光克, 藤田尚志, 矢崎一史, 渡辺隆司, 木竹酢液のウイルス不活性化物質の探索, 生存圏研究, 8, 49-54, 2012.
- 12) 小池智, ピコルナウイルスの感染初期過程, ウイルス, 61, 183-192, 2011.
- 13) 村上洋介, 口蹄疫ウイルスと口蹄疫の病性について(総説)  
<http://www.naro.affrc.go.jp/niah/fmd/explanation/018087.html>
- 14) Marumoto S, Yamamoto SP, Nishimura H, Onomoto K, Yatagai M, Yazaki K, Fujita T, Watanabe T., J. Agric. Food Chem., 60, 9106-11, 2012.