

木竹酢液のウイルス不活化物質の探索*

山元 誠司^{1,2,**}, 丸本 真輔^{1,**}, 西村 裕志¹, 尾野本 浩司^{2,***}, 谷田貝 光克³,
矢崎 一史¹, 藤田 尚志², 渡辺 隆司^{1,****}

Screening and identification of virus inactivators from wood and bamboo pyroligneous acids*

Seiji P. Yamamoto^{1,2,**}, Shinsuke Marumoto^{1,**}, Hiroshi Nishimura¹, Koji Onomoto^{2,***},
Mitsuyoshi Yatagai³, Kazufumi Yazaki¹, Takashi Fujita² and Takashi Watanabe^{1,****}

概要

地球温暖化や輸送手段の広域・高速化により、人畜に有害な病原体が広汎かつ迅速に伝播していることは大きな社会問題の一つとなっている。本研究では、再生産可能な木質・森林バイオマスの変換により人の健康や生活に寄与する有用な物質を生産するという新しい研究領域を開拓することを目的とし、木竹酢液の抗ウイルス活性について検討を進めている。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を含有する。木竹酢液は殺菌をはじめとする様々な生理活性を有することが報告されており、ウイルスなどの病原体の駆除にも有用なバイオマスである可能性が考えられるが、木竹酢液の抗ウイルス活性については十分な科学的根拠が示されているとは言い難い。本研究では、近年、日本や韓国をはじめとして各国で猛威をふるっている口蹄疫ウイルスなどに対する消毒薬を木竹酢液から生産することを視野に入れて、木竹酢液の抗ウイルス活性試験を行い、木竹酢液の消毒薬への応用の可能性と木竹酢液に含有される抗ウイルス活性物質の探索を行った。平成23年度は、口蹄疫ウイルスと同じピコルナウイルス科に属する脳筋炎ウイルス EMCV を用いて、竹酢液の抗ウイルス活性成分などを解析した。即ち、竹酢液のウイルス不活化活性を示す部分精製物の主要構成成分をすべて明らかにして、化学合成品を用いてウイルス不活化活性フラクションを再現した。さらに、再構築した成分再現液から一成分を除く方法により、ウイルス不活化活性に影響を与える化合物を解析し、ウイルス不活化にフェノールが大きく関与していることを明らかにした。また、フェノール単独のウイルス不活化活性が、部分精製物の活性より低いことから、フェノールと相乗的にウイルス不活化活性を高める物質の存在を明らかにし、酢酸がフェノールのウイルス不活化活性を増強することを示した¹⁾。

* 2012年11月27日受理

** 両著者は、等しく本稿に寄与している。

*** 現所属：千葉大学真菌医学研究センター

**** E-mail: twatanab@rishi.kyoto-u.ac.jp

¹ 〒611-0011 宇治市五ヶ庄 京都大学生存圏研究所

² 〒606-8397 京都市左京区聖護院川原町 京都大学ウイルス研究所

³ 秋田県立大学名誉教授、東京大学名誉教授

1. 研究の背景と目的

近年、光合成によるバイオマス資源が再生可能な持続資源として有望視されており、その 90%以上を占める木質・森林バイオマスから得られるバイオエネルギーや化成品が脚光を浴びている。注目すべきは、木質バイオマスを資源として利用する過程において産出される副次的な天然物もまた有用であることである。そのひとつとして、様々な生理活性を有する木竹酢液が挙げられる。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・凝縮させることで得られる液体である。粗木竹酢液を 90 日以上静置すると三層に分離し、その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が木竹酢液と呼ばれる pH 1.5~3.7 の液体である。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、これには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²⁾。木酢液の効能については古くから研究されており、農業など多方面で利用されてきた。木酢液は、イネいもち病やトマト灰色カビ病をはじめとした様々な農作物病害生物の防除に有効である。また、木酢液はトマトモザイクウイルスを完全に不活性化することも見出されており、ウイルスに対しても効果がある点で、木酢液と農薬は決定的に異なる³⁾。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、農薬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。我々は、木竹酢液の有する抗ウイルス効果に着目し、それが口蹄疫などのウイルス感染症予防に活用できるのではないかと考えた。

2010 年春、家畜伝染病である口蹄疫が日本では 10 年ぶりに宮崎県で発生し、29 万頭の牛や豚が殺処分されたことは記憶に新しい。口蹄疫は、ピコルナウイルス科の口蹄疫ウイルス (foot-and-mouth disease virus: FMDV) による牛、豚、羊などの偶蹄目の感染症である。FMDV 感染による致死率こそ低いものの、その高い伝播性や罹患し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。したがって、FMDV 感染においては予防対策が極めて重要である。現在、FMDV 感染予防法としては地面への消石灰散布が基本的に推奨されている。木竹酢液は、農業において植物の生育を促進させるために使用することからも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ラットへの経口投与実験 (急性毒性試験および 90 日反復毒性試験) などにより評価されている。基本的に FMDV は pH 7 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であろう。したがって、木竹酢液は FMDV 消毒薬の候補となりうることに疑いの余地はないが、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。実際には、生ウイルスの使用自体が日本では動物衛生研究所を除いて禁じられている。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 pH 3~9 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が分子レベルで解析可能となる。本研究では EMCV を FMDV のモデルウイルスとして使用し、木竹酢液のもつ潜在的な抗ウイルス作用を検討し、その活性物質を同定することを目的とする。

2. 研究の結果および考察

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。木酢液を用いた EMCV 不活化実験では、木竹酢液と混合して一時間反応させた EMCV の感染性が低下するかどうかを検討した。その結果、ウバメガシ (A)、ミズナラ (B)、モウソウチク (C)、アカマツ (D) 由来の木竹酢液 (図 1a) が

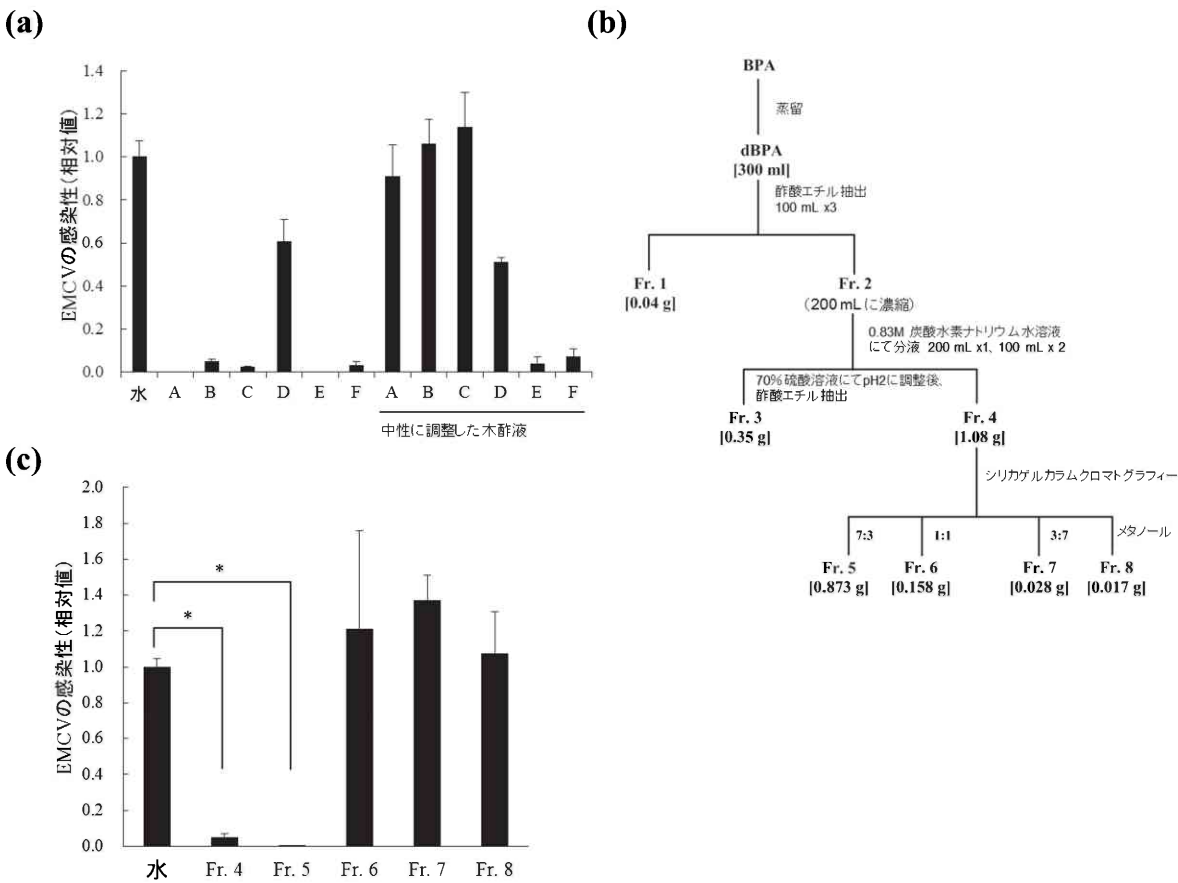


図 1 : 木竹酢液のウイルス不活化活性と分画。
a) 木竹酢液原液 (A:ウバメガシ、B: ミズナラ、C:モウソウチク、D:カラマツ) ならびに炭酸水素ナトリウムにより中和した中性木酢液のウイルス不活化活性。EMCV をそれぞれの木竹酢液と混合し、室温で 1 時間反応後、L929 細胞に感染させた。感染後 6 時間で細胞から RNA を回収、逆転写後、EMCV 特異的プライマーならびに SYBR Green を用いた定量 RT-PCR により細胞中の相対的ウイルス RNA 量を算出した。(b) 竹酢液 (bamboo pyroligneous acid: BPA) の分画スキーム。蒸留した竹酢液 (distilled BPA: dBPA) を酢酸エチルならびにシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて分画した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーはヘキサン:酢酸エチル 7:3、1:1、3:7 および 100%メタノールで順次溶出した。(c) 竹酢液画分のウイルス不活化活性。竹酢液の画分 (fraction: Fr.) 4~8 を用いて、上記と同様のウイルス不活化実験を行った。*はステューデント *t* 検定によって $P<0.05$ であることを示す。

EMCV の感染性を 1/10 以下に低下させるウイルス不活化活性を有するのに対し、アカマツ由来の木酢液 (図 1a D) にはその活性が認められなかった (図 1a)。

そこで、細胞毒性が最も低かったモウソウチク由来の竹酢液 (データ示さず) を図 1b に示す通りに分画し、それぞれの分画のウイルス不活化活性を上記と同様の方法にて検討した。その結果、蒸留竹酢液を酢酸エチル (EtOAc) にて親水性 (Fr. 1) と疎水性 (Fr. 2) に分離し、Fr. 2 をさらに 0.83 M 炭酸水素ナトリウム水溶液ならびに EtOAc にて抽出した疎水性画分

表 1 : Fr. 5 ならびの再構築した Fr. 5 の構成因子とその濃度。

No.	化合物	Fr. 5		再構築した Fr. 5	
		相対量 (%)	濃度 (mg/mL)*	相対量 (%)	濃度 (mg/mL)*
1	フルフラール	1.6	10.5	3.0	15.1
2	2-メチル-2-シクロペンテン-1-オン	0.3	0.8	0.4	1.4
3	アセチルフラン	1.0	6.2	2.0	8.2
4	5-メチルフルフラール	0.6	4.4	1.1	5.5
5	フェノール	35.5	155.0	25.0	98.0
6	o-クレゾール	4.3	23.5	4.3	33.0
7, 8	m - およびまたは p-クレゾール	9.8	53.0	16.2	58.7
9	グアイアコール	29.0	100.0	23.8	77.8
10	4-エチルフェノール	8.9	47.5	15.6	52.8
11	4-メチルグアイアコール	6.1	32.1	5.3	35.2
12	4-エチルグアイアコール	2.8	16.5	3.2	18.7
計		100.0	449	100.0	404.3

* 内部標準法にて定量

(Fr. 4) は EMCV の感染性を 1/20 程度まで抑制した (図 1c)。また、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて Fr. 4 をさらに 4 つの画分 (Fr. 5~8) に分画したところ、もっとも疎水性の高い Fr. 5 のみに Fr. 4 と同等のウイルス不活化活性が認められた (図 1c)。そこで、この Fr. 5 に含まれる化合物の同定を GC-MS 分析にて試みた。その結果、12 種類の化合物が Fr. 5 の主成分として同定された (表 1)。これらの化合物を、それぞれが Fr. 5 内の濃度になるように再構築した (表 1、図 2 再構築した Fr. 5)。

この再構築した Fr. 5 は、Fr. 5 と同様に EMCV の感染性を 1/20 程度に低下させたことから、Fr. 5 の性状を忠実に反映しているものと考えられる (図 3a All1)。そこでこの再構築した Fr. 5 から、12 種類の化合物をそれぞれ一つずつ差し引いたサンプル (図 3a #1~12) それぞれの活性を検討した結果、フェノール (#5) の除去によりウイルス不活化活性が完全に喪失した (図 3a)。さらに、フェノール以外の化合物を除いてもウイルス不活化活性に大きな変化は見られなかった (図 3a)。このことからフェノールが Fr. 5 中で唯一ウイルス不活化活性を有する化合物であることが示唆された。そこで、Fr. 5 中に存在する濃度のフェノール (EMCV との混合液中では 1%フェノール) を用いて EMCV 不活化実験を行ったところ、Fr. 5 と同様に EMCV の感染性を 1/20 程度に低下させたことから、フェノールが Fr. 5 のウイルス不活化活性に必要・十分であることが明らかとなった (図 3b)。

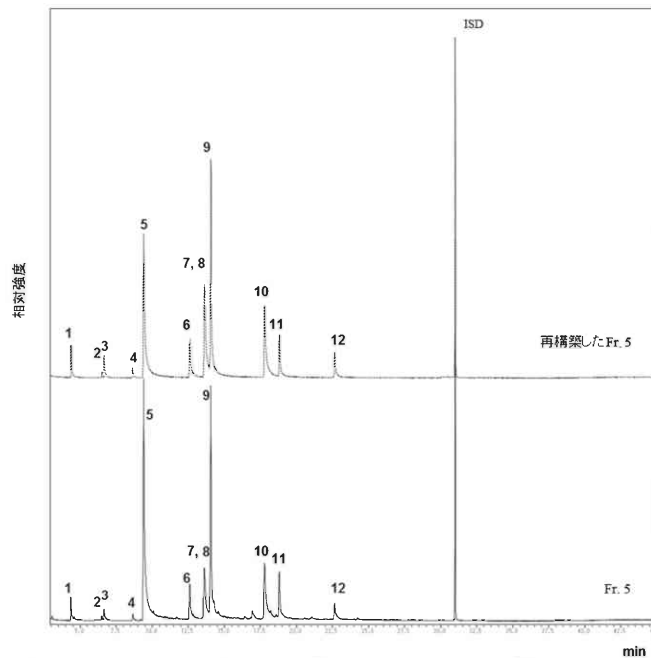
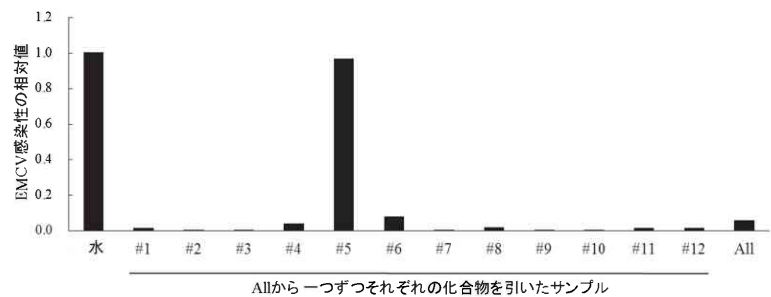


図 2 : Fr. 5 および再構築した Fr. 5 の GC-MS 分析により得られた TIC クロマトグラム。

(a)



(b)

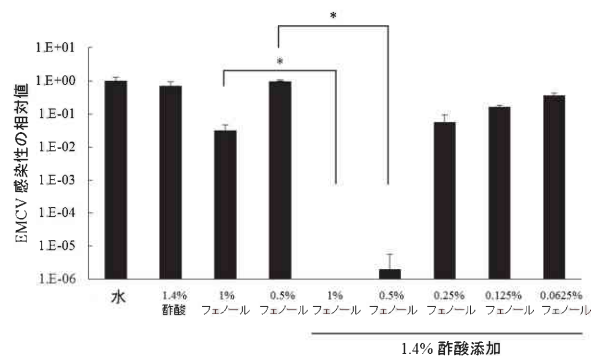


図 3 : ウイルス不活化因子フェノールの同定とその相乗効果

(a) 再構築した Fr.5 のウイルス不活化活性。再構築した Fr.5 (All)、ならびに All より 12 種類の化合物をそれぞれ一つずつ差し引いたサンプル (#1~12) を用いて前述と同様に EMCV 不活化実験を行った。(b) フェノールと酢酸の相乗効果。1.4%酢酸を含有するフェノールの 2 倍希釈系列を用いて前述と同様に EMCV 不活化実験を行った。*はステューデント *t* 検定によって $P < 0.05$ であることを示す。

また、竹酢液は、その主成分である酢酸により酸性の性質を有するため、酢酸が水溶性フェノールのウイルス不活化活性に影響を与える可能性がある。そこで、まず酢酸のみの影響を検討したところ、1.9%以下の酢酸はEMCVの感染性を変化させなかった（データ示さず）。そこで酢酸とフェノールの組み合わせがウイルス不活化活性に与える影響を検討したところ、1%フェノールのみではEMCVの感染性を1/50程度まで低下させるのに対し、1.4%酢酸との組み合わせによってEMCVの感染性は検出限界以下になった（図3b）。また、0.5%フェノールはEMCVの感染性になんら影響を与えなかったが、1.4%酢酸との組み合わせによってEMCVの感染性を10万分の1以下に減少させた（図3b）。これらの結果は、酢酸が水溶性フェノールのウイルス不活化活性を大きく増強することを示している。

では、酢酸とフェノールはどのように相乗効果を発揮しているのだろうか？高濃度のフェノールは蛋白質の変性による沈殿を引き起こすことでウイルスを不活化するが、低濃度のフェノールはウイルス性酵素の活性阻害あるいはそれらをウイルス粒子からの漏出させることでワクシニアウイルスや単純ヘルペス1型を不活化することが報告されている⁴⁾⁵⁾。しかしながら、EMCVをはじめとしたピコルナウイルスはウイルス粒子（キャプシド）内には酵素を含有しておらず、まず細胞内でそのウイルスゲノムRNAから蛋白質が翻訳されなければならない。つまり、ピコルナウイルスのゲノムRNAが宿主細胞の細胞質に入りさえすれば、複製が開始され得る。ピコルナウイルス科のウイルスの中で、メンゴウイルスやFMDVは低pHによってキャプシドの構造が変化することが報告されている⁶⁾⁷⁾。EMCVは低pH条件では細胞に侵入することができないが、pHが中性付近に戻ると感染性が回復する⁸⁾。これらの報告と合わせて考慮すると、酢酸による低pHによってEMCVのキャプシドの構造が変化、そしてフェノールの変性作用に対し脆弱となり、ウイルスゲノムRNAのウイルス粒子からの漏出が誘引され、結果としてウイルスの感染性が失われているのかもしれない。

上述したように、ウバメガシ、ミズナラ、モウソウチク、アカマツ由来の木竹酢液は中性条件下にてそのウイルス不活化活性を喪失する。すなわち、ウバメガシ、ミズナラとアカマツ由来の木酢液のウイルス不活化活性は、竹酢液の場合と同様にフェノールと酢酸の相乗効果に起因する可能性が考えられた（表2）。

表2：木竹酢液に含まれるフェノールおよび酢酸の含有量。

試料名	樹種	フェノール含有量 (mg/mL)	酢酸含有量 (%)
A	ウバメガシ	0.36	11.9
B	ミズナラ	0.07	2.5
C	モウソウチク	1.20	3.5
D	アカマツ	0.05	1.4

3. 今後の展開

今後は、ウイルス不活化物質の探索を様々な木竹酢液について行う。また、インフルエンザウイルス（オルトミクソウイルス科）など、他のウイルスに対する木竹酢液のウイルス不活化活性試験を行い、有効成分の同定を進める。

参考文献

- 1) Marumoto, S., Yamamoto, S., Nishimura, H., Onomoto, K., Yatagai, M., Yazaki, K., Fujita, T. and Watanabe, T. Identification of germicidal compound against picornavirus in bamboo pyroligneous acid, J. Agric. Food Chem. 60, 9106-9111. (2012).
- 2) Yatagai, M., Unrinin, G., and Ohira, T. By-products of wood carbonization. IV. Components of wood vinegars. Mokuzai Gakkaishi 34, 184-188. (1988).
- 3) Miyamoto, Y., Takeuchi, T., and Taniguchi, K. [Inactivation of tobacco mosaic virus by "Mokusaku-eki"]. Nihon shokubutsu byorigaku kaihou 27, 261. (1965).
- 4) Klein, M., and Deforest, A. Principles of Viral Inactivation. In Disinfection, sterilization, and preservation, S.S. Block, ed. (Lea & Febiger), pp. 422-434. (1983).

- 5) Prindle, R.F. Phenolic compounds. In Disinfection, sterillization, and preservation, S.S. Block, ed. (Lea & Febiger), pp. 197-198. (1983).
- 6) Madshus, I.H., Olsnes, S., and Sandvig, K. Different pH requirements for entry of the two picornaviruses, human rhinovirus 2 and murine encephalomyocarditis virus. *Virology* 139, 346-357. (1984).
- 7) Mak, T.W., O'Callaghan, D.J., and Colter, J.S. Studies of the pH inactivation of three variants of Mengo encephalomyelitis virus. *Virology* 40, 565-571. (1970).
- 8) Racaniello, V.R. Picornaviridae: The viruses and their replication. In *Fields VIROLOGY*, D.M. Knipe, and P.M. Howley, eds. (Lippincott Williams & Wilkins), pp. 795-838. (2006).