

(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2022-176153
(P2022-176153A)

(43)公開日 令和4年11月25日(2022. 11. 25)

(51)Int. Cl.			F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	36/185	(2006. 01)	A 6 1 K	36/185	4 C 0 8 6	
A 0 1 P	1/00	(2006. 01)	A 0 1 P	1/00	4 C 0 8 8	
A 0 1 N	65/00	(2009. 01)	A 0 1 N	65/00	G	4 H 0 1 1
A 0 1 N	65/08	(2009. 01)	A 0 1 N	65/08		
A 6 1 K	31/353	(2006. 01)	A 6 1 K	31/353		
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 25 頁) 最終頁に続く						
(21)出願番号 特願2022-78447(P2022-78447)			(71)出願人 504300088			
(22)出願日 令和4年5月11日(2022. 5. 11)			国立大学法人北海道国立大学機構			
(31)優先権主張番号 特願2021-81943(P2021-81943)			北海道帯広市稲田町西2線11番地			
(32)優先日 令和3年5月13日(2021. 5. 13)			(71)出願人 520159444			
(33)優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)			村田 敏拓			
			宮城県仙台市青葉区小松島4-4-1 東北医科薬科大学内			
			(72)発明者 武田 洋平			
			北海道帯広市稲田町西2線11番地 国立大学法人北海道国立大学機構帯広畜産大学内			
			(72)発明者 村田 敏拓			
			宮城県仙台市青葉区小松島4-4-1 東北医科薬科大学内			
最終頁に続く						

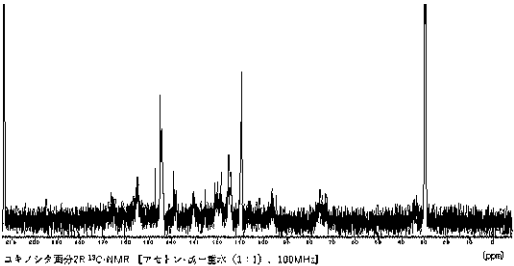
(54)【発明の名称】植物由来抽出物を有効成分とするウイルス不活化剤

(57)【要約】

【課題】 Saxifraga属植物から得られた成分であって、新型コロナウイルス、A型インフルエンザウイルス、ノロウイルスに対する不活化効果を有する成分を含む抗ウイルス剤、抗ウイルス性クリーム及びその製造方法を提供する。

【解決手段】 Saxifraga属のユキノシタ、ダイモンジソウ、ハルユキノシタ、ジンジソウ及びシコタンソウから成る群から選ばれる少なくとも1種の植物の粗抽出エキス、オープンカラムクロマトグラフィー画分、HPLC画分、有効成分である縮合型タンニンを含有する抗ウイルス剤。抗ウイルス剤として用いるための、Saxifraga属のユキノシタ、ダイモンジソウ、ハルユキノシタ、ジンジソウ及びシコタンソウから成る群から選ばれる少なくとも1種の植物からの縮合型タンニンを含む抽出物の製造方法。得られた抗ウイルス剤を含有するウイルス感染症治療剤、消毒薬、抗ウイルス性クリーム等の予防剤。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

タンニンを含むユキノシタ属 (*Saxifraga*) 植物の抽出物 (以下「ユキノシタ属抽出物」という。) を有効成分とする抗ウイルス剤。

【請求項 2】

前記ユキノシタ属抽出物が、ユキノシタ属植物をアセトン-水 4 : 1 の混合液に浸漬処理した抽出液を留去、乾固することで得られた粗抽出エキスである請求項 1 に記載の抗ウイルス剤。

【請求項 3】

前記ユキノシタ属抽出物が、請求項 2 で得られた粗抽出エキスを水で溶解し、スチレン-ジビニルベンゼン系合成吸着剤樹脂カラムに吸着させ、洗浄後、40%~60%メタノール/水で溶出した画分である請求項 1 に記載の抗ウイルス剤。

10

【請求項 4】

前記ユキノシタ属抽出物が、請求項 3 で得られた 40%~60%メタノール/水溶出画分を、逆相クロマトグラフィー用充填カラムに導入し、アセトニトリル/水で濃度勾配溶出させた精製画分である請求項 1 に記載の抗ウイルス剤。

【請求項 5】

前記ユキノシタ属抽出物が、少なくとも縮合型タンニンを含むものである請求項 1 から 4 のいずれかに記載の抗ウイルス剤。

20

【請求項 6】

前記ユキノシタ属抽出物が、タンニン (1 量体~18 量体) を含む請求項 1 から 4 のいずれかに記載の抗ウイルス剤。

【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれかに記載の抗ウイルス剤を含むことを特徴とする新型コロナウイルス、A 型インフルエンザウイルス、ノロウイルスに起因する感染症の治療剤、消毒薬や抗ウイルス性クリーム等の予防剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は新規抗ウイルス剤に関する。さらに詳しくは *Saxifraga* 属植物由来抽出物を有効成分とする新規ウイルス不活化剤に関するものである。

30

【背景技術】

【0002】

新型コロナウイルス (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*: SARS-CoV-2) や A 型インフルエンザウイルス、ノロウイルスはヒトに感染し世界中で膨大な数の感染者、死亡者を出す公衆衛生上重要な病原ウイルスである。これら病原ウイルスの感染拡大を防ぐための重要なアプローチのひとつとして、ウイルス不活化活性を有する物質を用いた環境中のウイルス (または身体に付着したウイルス) の不活化が挙げられる。新型コロナウイルスや A 型インフルエンザウイルスといったエンベロープを有するウイルスの不活化においてはアルコール消毒薬が非常に有効である。

40

【0003】

一方、エンベロープを有さないノロウイルスでは、ウイルス株によってはアルコールに抵抗性があり容易に不活化されない場合もある。そのためノロウイルスの不活化には次亜塩素酸ナトリウムの使用が推奨されている。

【0004】

人体への安全性を重視し、天然物由来の抗ウイルス剤の探索もなされており、オリーブの葉に含まれるヒドロキシチロソールがインフルエンザウイルスに対する不活化能を有している、との報告がある (特許文献 1)。また柿タンニンがエンベロープを持たないノロウイルスに対するウイルス不活化能を有しているとの報告もある (特許文献 2)。

【0005】

ユキノシタ (*Saxifraga stolonifera*)、ダイモンジソウ (*Saxifraga fortunei*)、ハルユキノシタ (*Saxifraga nipponica*)、ジンジソウ (*Saxifraga cortusifolia*) 及びシコタンソウ (*Saxifraga bronchialis*) は日本に自生するユキノシタ科 (*Saxifragaceae*) ユキノシタ属 (*Saxifraga* 属) の多年草である。ユキノシタは葉を生薬コジソウと称し、民間薬として解熱・解毒・消炎に用いる。具体的には、湿疹、蕁麻疹、咳、膿痰に煎じて飲む。外用に葉から絞った汁を化膿性中耳炎に点耳する。挫創や腫れ物に生薬の汁をつける。などの方法がとられるほか、健康茶として美白、利尿、消炎などを目的に利用されている。含有成分として硝酸カリウム、塩化カリウム、クエルシトリン、アルブチン、ベルゲニン、カテキン、縮合型タンニンなどが知られる (非特許文献1, 2)。ダイモンジソウも薬用として利尿などに用い、また食用とされるが、含有成分は精査されていない (非特許文献1)。

10

【0006】

このようにユキノシタ及びダイモンジソウはどちらも日本において薬用とされ食経験もある野草である。また、ユキノシタ、ダイモンジソウ、ハルユキノシタ、ジンジソウ及びシコタンソウはいずれも庭や玄関などを彩る観賞用植物として日本国内で栽培され、流通している植物である。このようにユキノシタ属植物は日本において身近な存在であり、多方面で利用されているが、これまでウイルスの不活化に利用されたことはなく、また抗ウイルス作用の報告例もなかった。

20

【0007】

Takeda et al., *Viruses* (非特許文献3) では、モンゴル産ユキノシタ属植物から抽出精製したガロカテキンガレート (GCG)、エピガロカテキンガレート (EGCG) をはじめ、ガロイル基を有する化合物が抗ウイルス活性を示すことが報告されている。しかし、その抗ウイルス活性の強さは化合物精製前の画分の抗ウイルス活性の強さには及ばなかった。またそれら化合物それぞれの含有量は比較的少量であり、またユキノシタ属に共通する成分であるかも不明であった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

30

【特許文献1】国際公開番号WO2008/143137

【特許文献2】国際公開番号WO2008/060705

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】岡田稔ら., 新訂原色牧野和漢薬草大図鑑. 2002:161

【非特許文献2】波多野力ら., 和漢医薬学会誌. 1986, 3:434-435

【非特許文献3】Takeda et al., *Viruses* 12:699. 2020.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0010】

新型コロナウイルスの感染拡大初期に消毒用エタノールが入手できない事態となったが、今後再びウイルスの世界的な流行 (パンデミック) が起こった際などには深刻な消毒剤の供給不足が生じる恐れがある。更にはアルコールに対し有害応答を示す人々が一定数存在することや、医療従事者等において度重なるアルコール消毒薬の使用が原因の皮膚トラブルが発生する可能性があるといった問題もある。

【0011】

またアルコールに抵抗性を示すノロウイルスに効果を有す次亜塩素酸ナトリウム溶液であるが、次亜塩素酸ナトリウムは人体に対し有害であり、かつ金属素材などを腐食させるため取り扱いが容易ではない。その他、各種病原ウイルスに対し不活化活性を有する化学

50

物質が複数同定されているが、それらの多くが人体への有害性や環境汚染性、残留性などを有しているため、安全かつ容易に環境中や身体に付着したウイルスの消毒に使用できる物質は限定されている。

【課題を解決するための手段】

【0012】

発明者らはユキノシタ (*Saxifraga stolonifera*)、ダイモンジソウ (*Saxifraga fortunei*)、ハルユキノシタ (*Saxifraga nipponica*)、ジンジソウ (*Saxifraga cortusifolia*) 及びシコタンソウ (*Saxifraga bronchialis*) 由来の粗抽出エキス、特定の分画画分、及び分画画分から精製した化合物が新型コロナウイルスやA型インフルエンザウイルス、ヒトノロウイルスの代替ウイルスである猫カリシウイルスやマウスノロウイルスを短時間で不活化することを見出し、更に皮膚表面に塗布可能な抗ウイルス性クリームを作出したことにより本発明を完成させた。

10

【0013】

即ち、本発明は、

(1) タンニンを含むユキノシタ属 (*Saxifraga*) 植物の抽出物 (以下「ユキノシタ属抽出物」と表記) を有効成分とする抗ウイルス剤。

(2) 前記ユキノシタ属抽出物が、ユキノシタ属植物をアセトン-水 4 : 1 の混合液に浸漬処理した抽出液を留去、乾固することで得られた粗抽出エキスである (1) に記載の抗ウイルス剤。

20

(3) 前記ユキノシタ属抽出物が、(2) で得られた粗抽出エキスを水で溶解し、スチレン-ジビニルベンゼン系合成吸着剤樹脂カラムに吸着させ、洗浄後、40%~60%メタノール/水で溶出した画分である (1) に記載の抗ウイルス剤。

(4) 前記ユキノシタ属抽出物が、(3) で得られた40%~60%メタノール/水溶出画分を、逆相クロマトグラフィー用充填カラムに導入し、アセトニトリル/水で濃度勾配溶出させた精製画分である (1) に記載の抗ウイルス剤。

(5) 前記ユキノシタ属抽出物が、少なくとも縮合型タンニンを含むものである (1) から (4) のいずれかに記載の抗ウイルス剤。

(6) 前記ユキノシタ属抽出物が、タンニン (1量体~18量体) を含む (1) から (4) のいずれかに記載の抗ウイルス剤。

30

(7) (1) から (6) のいずれかに記載の抗ウイルス剤を含むことを特徴とする新型コロナウイルス、A型インフルエンザウイルス、ノロウイルスに起因する感染症の治療剤、消毒薬や抗ウイルス性クリーム等の予防剤。

【発明の効果】

【0014】

本発明は、ユキノシタ属植物抽出物とその有効成分である縮合型タンニンについて、新型コロナウイルス、A型インフルエンザウイルス、ノロウイルスに対する抗ウイルス剤としての有効成分とする新規な有用性および用途を提供する。ユキノシタ属植物は日本において薬用とされ食経験もある野草であり、ヒトや動物に対する安全性が高く、本発明の抗ウイルス剤は食品として摂取することや抗ウイルス性ハンドクリームとして応用することも可能である。

40

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】ユキノシタ属タンニンの¹³C NMRスペクトル

【図2】ユキノシタから得られた画分の¹³C NMRスペクトル (ユキノシタ画分1C)。

【図3】ユキノシタから得られた画分の¹³C NMRスペクトル (ユキノシタ画分1D)。

【図4】ユキノシタから得られた画分の¹³C NMRスペクトル (ユキノシタ画分3H + 3I)。

50

【図5】ダイモンジソウから得られた画分の ^{13}C NMRスペクトル（ダイモンジソウ画分1C）。

【図6】ダイモンジソウから得られた画分の ^{13}C NMRスペクトル（ダイモンジソウ画分1D）。

【図7】ダイモンジソウから得られた画分の ^{13}C NMRスペクトル（ダイモンジソウ画分2H）。

【図8】ダイモンジソウから得られた画分の ^{13}C NMRスペクトル（ダイモンジソウ画分3G）。

【図9】ハルユキノシタから得られた画分の ^{13}C NMRスペクトル（ハルユキノシタ画分1C）。

【図10】ハルユキノシタから得られた画分の ^{13}C NMRスペクトル（ハルユキノシタ画分1D）。

【図11】ハルユキノシタから得られた画分の ^{13}C NMRスペクトル（ハルユキノシタ画分2E+3F）。

【図12】ジンジソウから得られた画分の ^{13}C NMRスペクトル（ジンジソウ画分1C）。

【図13】ジンジソウから得られた画分の ^{13}C NMRスペクトル（ジンジソウ画分1D）。

【図14】ジンジソウから得られた画分の ^{13}C NMRスペクトル（ジンジソウ画分2E+3F）。

【図15】シコタンソウから得られた画分の ^{13}C NMRスペクトル（シコタンソウ画分1C）。

【図16】シコタンソウから得られた画分の ^{13}C NMRスペクトル（シコタンソウ画分2E）。

【図17】基剤クリームにユキノシタ画分1Dを添加したクリームのウイルス不活化活性。

【図18】Linear TOFモードでMALDI-TOF-MS測定した、ユキノシタ属タンニン並びに活性画分。

【図19】Spiral TOFモードでMALDI-TOF-MS測定した、ユキノシタ属タンニン並びに活性画分。

【図20】ユキノシタ画分2R（ $100\mu\text{g}/\text{mL}$ ）またはコントロール（DMSO）で新型コロナウイルスまたはA型インフルエンザウイルスを24時間、マウスノロウイルスを6時間処理した各種ウイルスの構造タンパク質を標的としたウエスタンブロッティング解析結果。

【図21】ユキノシタ画分2R（ $100\mu\text{g}/\text{mL}$ ）またはコントロール（DMSO）で3時間処理した各種ウイルスのウイルス粒子構造観察結果。

【発明を実施するための形態】

【0016】

<製造方法>

本発明のウイルス不活化剤として用いるための、ユキノシタ属植物から選ばれる少なくとも1種の植物の抽出物は、例えば、前記植物の一部もしくは全植物体を抽出溶媒で抽出することで製造することができる。ここで用いる抽出溶媒としては、一般には水及び有機溶媒、好ましくはメタノール、エタノール、プロパノール、アセトン等の水混和性溶媒が挙げられる。抽出溶媒は限定されるものではないが、アセトンと水とを4：1の比率で混合した溶媒で行うことが、有効成分が高い濃度で含有される抽出液が得られるという観点から好ましい。また溶媒の沸点に応じて40-100℃に加温、加熱して抽出操作を行うことで抽出効率を高めることができる。抽出効率という観点からは、植物は、粉碎または裁断等した物であることが好ましい。粉碎または裁断等した物の寸法に特に制限はなく、植物の種類にもよるが、例えば、最も長い部分の長さを5mm以内とすることができる。また、乾燥の程度によらず有効成分が得られるため、植物は抽出前に適宜乾燥することも

10

20

30

40

50

できる。

【0017】

溶媒の留去の程度は、特に制限はないが、後の利用や精製の方法によっては、溶媒をほぼ留去し、エキスを乾固することが好ましい。

【0018】

精製は、液液分配、順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、向流クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、遠心分離、限外ろ過等を適宜組み合わせることにより行うことができる。植物から得た抽出エキスを、水に溶解させ、それをスチレンージビニルベンゼン系合成吸着剤樹脂カラムに吸着させた場合、はじめに水や20%メタノール／水の溶出溶媒を流すことで、不溶物・不要物を除いた後、40%～60%メタノール／水の溶出溶媒により溶出した画分に有効成分が高い濃度で含有されることから、この方法で行うことが好ましい。

10

【0019】

更に、前記の精製方法を複数組み合わせ、あるいは繰り返し行うことで有効成分濃度を上げることができる。逆相系ODSカラムを使用した有効成分の精製と構造の決定については実施例で後述する。

【0020】

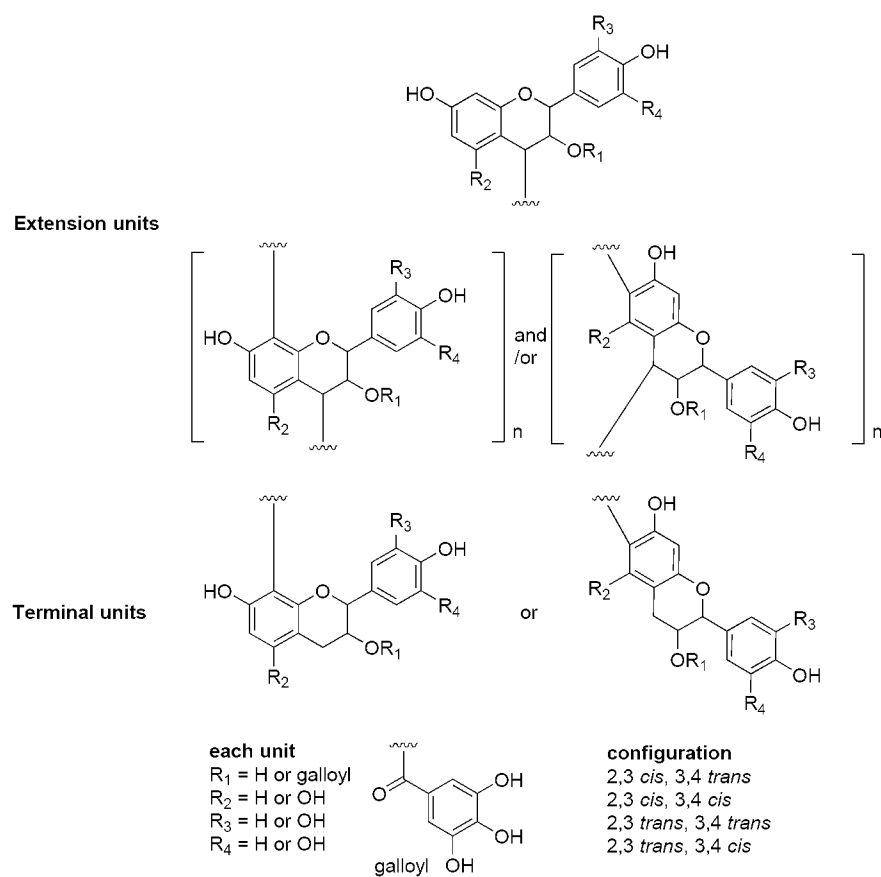
以上のようにして得られる下記式(I)、(II)で示されるユキノシタ属タンニン、及びそれを含む画分やエキスは、ウイルス不活化剤として使用できる。

20

ユキノシタ属タンニンの化学構造

炭素番号は下記式(II)を参照。縮合型タンニンは、フラバンー3-オール構造を基本単位にフラボノイドC-4位-6位間、また／あるいはC-4位-8位間で重合し、多量体構造となっている。フラバンー3-オール基本単位の種類、重合の結合様式、重合度、アシル基の有無に多様性がみられ、一般的に植物抽出エキスから得られる縮合型タンニンは単一の化合物としてではなく、前述した多数の重合度や結合様式、構成単位の構造が異なった重合体の混合物状態で下記式(I)のように得られる。

【化 1】



(I) 縮合型タンニンの構造の例

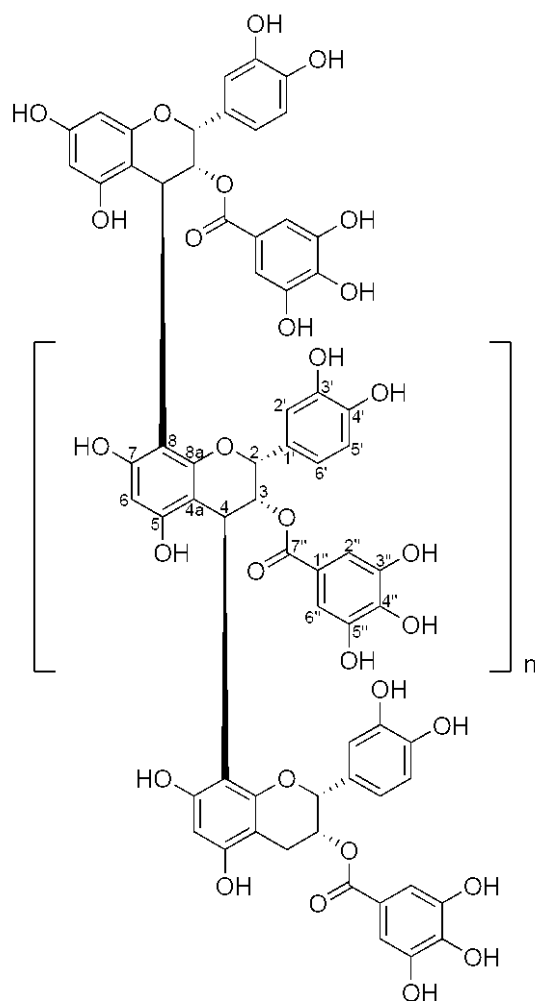
[illegible]

【 0 0 2 1 】

【 0 0 2 2 】

40

【化 2】



(Ⅱ) ユキノシタ属タンニンの推定化学構造

【0023】

^{13}C -NMR [アセトン- d_6 -重水 (1:1)、100MHz、JEOL-JNM-AL400] 167-164 ppm (C-7''), 158-153 ppm (C-5、7、8a)、146-143 ppm (C-3'、4'、3'', 5''), 140-137 ppm (C-4''), 132-129 ppm (C-1'), 122-118 ppm (C-6'、1''), 117-113 ppm (C-2'、5'), 111-109 ppm (C-2'', 6''), 108-105 ppm (C-8)、98-94 ppm (C-4a、6)、80-72 ppm (C-2、3)、35-32 ppm (C-4)。

【0024】

ユキノシタ属タンニンを含む画分をアセトン-水混合液に溶解し、アミコンウルトラ15ウルトラセル10K (Merck Millipore Ltd.) に入れて遠心分離 (4500 rpm、20分間) をかけると、ほぼ全ての溶解液が限外ろ過膜を通過した。そこで通過した溶解液を更にアミコンウルトラ15ウルトラセル3K (Merck Millipore Ltd.) に入れて遠心分離 (4500 rpm、10時間) をかけると、溶媒と分子量がおおよそ1000未満の低分子化合物が限外ろ過膜を通過したことがNMRにより確認でき、ユキノシタ属タンニンがフィルター上部に高度に濃縮されて得られることから、ユキノシタ属タンニンの主成分の分子量は1000-10000である。

【0025】

また、実施例で後述するユキノシタ属タンニン精製画分についてMALDI-TOF-MS (質量分析) 測定を行った。なお、[図18]、[図19] 中で示した各サンプルは

SST-2R（ユキノシタ由来ユキノシタ属タンニンで、実施例〔0031〕で述べるユキノシタ画分2Rと同義）、SFo-3G（ダイモンジソウ由来ユキノシタ属タンニンで、実施例〔0038〕で述べるダイモンジソウ画分3Gと同義）、KT₂₀₂₁-10（タンニン精製の一段階前のユキノシタ由来粗分画画分でユキノシタ画分1Dと同等）である。

【0026】

図18はLinearTOFモードで測定したMALDI-TOF-MSの結果である。測定試料由来と想定されるシグナルが m/z 8, 000付近まで観測されたことから、ユキノシタ属タンニンの分子量分布は1, 000～10, 000程度とした推測が裏付けられた。また、主に440u間隔でシグナルが観測されたことから、(II)ユキノシタ属タンニンの推定化学構造で示した構造式の通り、(エピ)カテキンガレート構造の繰り返し構造であることが支持された。これら知見により、ユキノシタ属タンニンは1～18量体程度であると決定できる。

10

【0027】

図19はSpiralTOFモードで測定したMALDI-TOF-MSの結果である。ユキノシタ属タンニン（SST-2R、SFo-3G）、ならびにその前の粗分画段階（KT₂₀₂₁-10）でも共通して440u間隔でシグナルが観測された。この結果からは、ユキノシタ属タンニンが活性画分に共通して含まれる成分であり、またユキノシタとダイモンジソウとで構造や重合度に大きな違いはないことを示している。さらにシグナルの強度から、多量体のうち3～7量体の存在比が大きいことが考察された。以上により、ユキノシタ属タンニンは、(エピ)カテキンガレートの繰り返し構造であり、3～7量体を中心とした、18量体程度（ m/z 8, 000）までの範囲で存在することが確認された。

20

【実施例】

【0028】

以下、非限定的な実施例を示して、本発明をさらに詳細に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0029】

<実施例1>

植物

30

日本産ユキノシタ、ダイモンジソウ、ハルユキノシタ、ジンジソウ、シコタンソウはいずれも栽培品を用いた。ただし、クリーム作出用には生薬販売品のユキノシタ（株式会社小島漢方）を用いた。

【0030】

・ユキノシタからの抽出

ユキノシタの抽出と分画

乾燥したユキノシタ全草10gをアセトン-水（4：1）の混合液に一か月間浸漬し、成分を抽出した。抽出液を留去して乾固させ、粗抽出エキス（2.6g）とした。次にこれを水に溶解させて、スチレン-ジビニルベンゼン系合成吸着剤樹脂である三菱化学Diaion HP-20樹脂（60g）を担体に用いたオープンカラムに付し、クロマトグラフィーによって分画した。溶出は次のメタノールと水の混合液を用いて順次行い、濃縮乾固することで括弧内の重量の各分画フラクション（ユキノシタ画分1A～1F）、即ち、水画分300mL（ユキノシタ画分1A、1.55g）、20%メタノール画分300mL（ユキノシタ画分1B、101mg）、40%メタノール画分300mL（ユキノシタ画分1C、282mg）、60%メタノール画分300mL（ユキノシタ画分1D、355mg）、90%メタノール画分300mL（ユキノシタ画分1E、35.2mg）、メタノール画分300mL（ユキノシタ画分1F、11.6mg）を得た。

40

【0031】

これらのうち、40%メタノール画分（ユキノシタ画分1C）について更にHPLC（ポンプ：8.0mL/min、カラム：TOSOH ODS-120T, 21.5mm

50

I. D. × 300 mm、検出：紫外吸収 210 nm) で精製を行った。溶出溶媒には 10 % アセトニトリル／水 (0.2 % トリフルオロ酢酸添加) から 30 % アセトニトリル／水 (0.2 % トリフルオロ酢酸添加) に至る濃度勾配をつけた組成を用いた。クロマトグラムの形状によって分画し、溶出液を濃縮乾固することで合計 20 種類の分画フラクション (ユキノシタ画分 2 A ~ 2 T)、即ち、ユキノシタ画分 2 A ~ 2 Q (合計 134.2 mg)、ユキノシタ画分 2 R (45.1 mg)、ユキノシタ画分 2 S ~ 2 T (合計 29.4 mg) を得た。

【0032】

とりわけ強いウイルス不活化活性を示したユキノシタ画分 2 R について NMR を測定し、含有化合物の化学構造を推定したところ、縮合型タンニンに特有の ^{13}C NMR スペクトルが得られた [図 1]。このことからユキノシタ画分 2 R をユキノシタ属タンニンと決定し、これをユキノシタ抽出物においてウイルス不活化する最も有力な活性本体として特定した。

10

【0033】

以下、これと同等のユキノシタ属抽出物をユキノシタ属タンニンと表記する。なお、ユキノシタ画分 2 A ~ ユキノシタ画分 2 T において、ユキノシタ属タンニンはユキノシタ画分 2 L ~ ユキノシタ画分 2 T に及ぶ周辺の画分にも含まれていた。このように、ユキノシタ属タンニンを含むエキスならびに画分について、カラムクロマトグラフィーによる分離操作で、1. ユキノシタ属タンニンの純度を上げることができ、また、2. 最もユキノシタ属タンニン濃度が高い画分の周辺画分にもユキノシタ属タンニンが含まれていることは、以下で述べるユキノシタ並びにユキノシタ以外のユキノシタ属植物の分離操作に共通である。

20

【0034】

次に 60 % メタノール画分 (ユキノシタ画分 1 D) について HPLC (ポンプ：8.0 mL/min、カラム：TOSOH ODS-120T, 21.5 mm I. D. × 300 mm、検出：紫外吸収 210 nm) で精製を行った。溶出溶媒には 20 % アセトニトリル／水 (0.2 % トリフルオロ酢酸添加) から 30 % アセトニトリル／水 (0.2 % トリフルオロ酢酸添加) に至る濃度勾配をつけた組成を用いた。クロマトグラムの形状によって分画し、溶出液を濃縮乾固することで合計 11 種類の分画フラクション (画分ユキノシタ画分 3 A ~ 3 K)、即ち、ユキノシタ画分 3 A ~ 3 G (合計 118.0 mg)、ユキノシタ画分 3 H 及び 3 I (合計 98.0 mg)、ユキノシタ画分 3 J ~ 3 K (合計 29.7 mg) を得た。このうちユキノシタ画分 3 H 及び 3 I はユキノシタ属タンニンであった [図 4]。

30

【0035】

ユキノシタ画分 1 C の抗ウイルス活性本体がユキノシタ属タンニンであることが特定されたことから、ユキノシタ画分 1 C と同様に抗ウイルス活性を示したユキノシタ画分 1 D についても ^{13}C NMR 測定したところ、いずれにも主成分としてユキノシタ属タンニンが含まれていた [図 2、図 3]。

【0036】

・ダイモンジソウからの抽出
ダイモンジソウの抽出と分画

40

乾燥したダイモンジソウ地上部 61 g をアセトン－水 (4 : 1) の混合液に一週間浸漬し、成分を抽出した。抽出液を留去して乾固させ、粗抽出エキス (10.9 g) とした。次にこれを水に溶解させて三菱化学 Diaion HP-20 樹脂 (200 g) を担体に用いたオープンカラムに付し、クロマトグラフィーによって分画した。溶出はメタノールと水の混合液を用いて順次行い、濃縮乾固することで括弧内の重量の各分画フラクション (ダイモンジソウ画分 1 A ~ 1 F) 即ち、水画分 600 mL (ダイモンジソウ画分 1 A、5.29 g)、20 % メタノール画分 60 mL (ダイモンジソウ画分 1 B、316.3 mg)、40 % メタノール画分 600 mL (ダイモンジソウ画分 1 C、362.0 mg)、60 % メタノール画分 600 mL (ダイモンジソウ画分 1 D、745.8 mg)、90 %

50

メタノール画分600mL（ダイモンジソウ画分1E、161.8mg）、メタノール画分600mL（ダイモンジソウ画分1F、30.1mg）を得た。うち、40%メタノール画分（ダイモンジソウ画分1C）及び60%メタノール画分（ダイモンジソウ画分1D）は、NMRスペクトルにより、その主成分はユキノシタ属タンニンであった〔図5、図6〕。

【0037】

ダイモンジソウ画分1CについてHPLC（ポンプ：8.0mL/min、カラム：TOSOH ODS-120T, 21.5mm I.D. × 300mm、検出：紫外吸収210nm）で精製を行った。溶出溶媒には20%アセトニトリル/水（0.2%トリフルオロ酢酸添加）から30%アセトニトリル/水（0.2%トリフルオロ酢酸添加）に至る濃度勾配をつけた組成を用いた。クロマトグラムの形状によって分画し、溶出液を濃縮乾固することで合計9種類の分画フラクション（ダイモンジソウ画分2A～2I）、即ち、ダイモンジソウ画分2A～2G（合計138.5mg）、ダイモンジソウ画分2H（22.5mg）、ダイモンジソウ画分2I（6.3mg）を得た。ダイモンジソウ画分2HはNMRスペクトルよりユキノシタ属タンニンであった〔図7〕。

10

【0038】

ダイモンジソウ画分1DについてHPLC（ポンプ：8.0mL/min、カラム：TOSOH ODS-120T, 21.5mm I.D. × 300mm、検出：紫外吸収210nm）で精製を行った。溶出溶媒には20%アセトニトリル/水（0.2%トリフルオロ酢酸添加）から30%アセトニトリル/水（0.2%トリフルオロ酢酸添加）に至る濃度勾配をつけた組成を用いた。クロマトグラムの形状によって分画し、溶出液を濃縮乾固することで合計8種類の分画フラクション（ダイモンジソウ画分3A～3H）、即ち、ダイモンジソウ画分3A～3F（合計116.3mg）、ダイモンジソウ画分3G（44.7mg）、ダイモンジソウ画分3H（16.0mg）を得た。ダイモンジソウ画分3GはNMRスペクトルよりユキノシタ属タンニンであった〔図8〕。

20

【0039】

・ハルユキノシタの抽出と分画

乾燥したハルユキノシタ地上部230gをアセトン-水（4：1）の混合液に一週間浸漬し、成分を抽出した。抽出液を留去して乾固させ、粗抽出エキス（13.2g）とした。次にこれを水に溶解させて三菱化学Diaion HP-20樹脂（200g）を担体に用いたオープンカラムに付し、クロマトグラフィーによって分画した。溶出はメタノールと水の混合液を用いて順次行い、濃縮乾固することで括弧内の重量の各分画フラクション（ハルユキノシタ画分1A～1F）即ち、水画分600mL（ハルユキノシタ画分1A、10.1g）、20%メタノール画分600mL（ハルユキノシタ画分1B、156.1mg）、40%メタノール画分600mL（ハルユキノシタ画分1C、299.6mg）、60%メタノール画分600mL（ハルユキノシタ画分1D、438.4mg）、90%メタノール画分600mL（ハルユキノシタ画分1E、230.3mg）、メタノール画分600mL（ハルユキノシタ画分1F、14.5mg）を得た。うち、40%メタノール画分（ハルユキノシタ画分1C）及び60%メタノール画分（ハルユキノシタ画分1D）は、NMRスペクトルにより、その主成分はユキノシタ属タンニンであった〔図9、図10〕。

30

40

【0040】

ハルユキノシタ画分1CについてHPLC（ポンプ：8.0mL/min、カラム：TOSOH ODS-120T, 21.5mm I.D. × 300mm、検出：紫外吸収210nm）で精製を行った。溶出溶媒には20%アセトニトリル/水（0.2%トリフルオロ酢酸添加）から30%アセトニトリル/水（0.2%トリフルオロ酢酸添加）に至る濃度勾配をつけた組成を用いた。クロマトグラムの形状によって分画し、溶出液を濃縮乾固することで合計6種類の分画フラクション（ハルユキノシタ画分2A～2F）、即ち、ハルユキノシタ画分2A～2D（合計187.3mg）、ハルユキノシタ画分2E（7.5mg）、ハルユキノシタ画分2F（2.4mg）を得た。ハルユキノシタ画分2EはN

50

MRスペクトルよりユキノシタ属タンニンであった〔図11〕。

【0041】

ハルユキノシタ画分1DについてHPLC（ポンプ：8.0mL/min、カラム：TOSOH ODS-120T, 21.5mm I.D. × 300mm、検出：紫外吸収210nm）で精製を行った。溶出溶媒には20%アセトニトリル/水（0.2%トリフルオロ酢酸添加）から30%アセトニトリル/水（0.2%トリフルオロ酢酸添加）に至る濃度勾配をつけた組成を用いた。クロマトグラムの形状によって分画し、溶出液を濃縮乾固することで合計7種類の分画フラクション（ハルユキノシタ画分3A～3G）、即ち、ハルユキノシタ画分3A～3E（合計217.0mg）、ハルユキノシタ画分3F（23.5mg）、ハルユキノシタ画分3G（3.6mg）を得た。ハルユキノシタ画分3FはNMRスペクトルよりユキノシタ属タンニンであった〔図11〕。

10

【0042】

・ジンジソウの抽出と分画

乾燥したジンジソウ地上部19gをアセトン-水（4：1）の混合液に一週間浸漬し、成分を抽出した。抽出液を留去して乾固させ、粗抽出エキス（3.0g）とした。次にこれを水に溶解させて三菱化学Diaion HP-20樹脂（50g）を担体に用いたオープンカラムに付し、クロマトグラフィーによって分画した。溶出はメタノールと水の混合液を用いて順次行い、濃縮乾固することで括弧内の重量の各分画フラクション（ジンジソウ画分1A～1F）即ち、水画分300mL（ジンジソウ画分1A、1.53g）、20%メタノール画分300mL（ジンジソウ画分1B、176.2mg）、40%メタノール画分300mL（ジンジソウ画分1C、344.9mg）、60%メタノール画分300mL（ジンジソウ画分1D、217.8mg）、90%メタノール画分300mL（ジンジソウ画分1E、52.8mg）、メタノール画分300mL（ジンジソウ画分1F、27.9mg）を得た。うち、40%メタノール画分（ジンジソウ画分1C）及び60%メタノール画分（ジンジソウ画分1D）は、NMRスペクトルにより、その主成分はユキノシタ属タンニンであった〔図12、図13〕。

20

【0043】

ジンジソウ画分1CについてHPLC（ポンプ：8.0mL/min、カラム：TOSOH ODS-120T, 21.5mm I.D. × 300mm、検出：紫外吸収210nm）で精製を行った。溶出溶媒には20%アセトニトリル/水（0.2%トリフルオロ酢酸添加）から30%アセトニトリル/水（0.2%トリフルオロ酢酸添加）に至る濃度勾配をつけた組成を用いた。クロマトグラムの形状によって分画し、溶出液を濃縮乾固することで合計6種類の分画フラクション（ジンジソウ画分2A～2F）、即ち、ジンジソウ画分2A～2D（合計235.6mg）、ジンジソウ画分2E（15.2mg）、ジンジソウ画分2F（2.9mg）を得た。ジンジソウ画分2EはNMRスペクトルよりユキノシタ属タンニンであった〔図14〕。

30

【0044】

ジンジソウ画分1DについてHPLC（ポンプ：8.0mL/min、カラム：TOSOH ODS-120T, 21.5mm I.D. × 300mm、検出：紫外吸収210nm）で精製を行った。溶出溶媒には20%アセトニトリル/水（0.2%トリフルオロ酢酸添加）から30%アセトニトリル/水（0.2%トリフルオロ酢酸添加）に至る濃度勾配をつけた組成を用いた。クロマトグラムの形状によって分画し、溶出液を濃縮乾固することで合計7種類の分画フラクション（ジンジソウ画分3A～3G）、即ち、ジンジソウ画分3A～3E（合計112.9mg）、ジンジソウ画分3F（24.4mg）、ジンジソウ画分3G（9.7mg）を得た。ジンジソウ画分3FはNMRスペクトルよりユキノシタ属タンニンであった〔図14〕。

40

【0045】

・シコタンソウの抽出と分画

乾燥したシコタンソウ地上部19.3gをアセトン-水（4：1）の混合液に一週間浸漬し、成分を抽出した。抽出液を留去して乾固させ、粗抽出エキス（0.77g）とした

50

。次にこれを水に溶解させて三菱化学Diaion HP-20樹脂(50g)を担体に用いたオープンカラムに付し、クロマトグラフィーによって分画した。溶出はメタノールと水の混合液を用いて順次行い、濃縮乾固することで括弧内の重量の各分画フラクション(シコタンソウ画分1A~1F)即ち、水画分300mL(シコタンソウ画分1A、278.7mg)、20%メタノール画分300mL(シコタンソウ画分1B、39.8mg)、40%メタノール画分300mL(シコタンソウ画分1C、201.1mg)、60%メタノール画分300mL(シコタンソウ画分1D、45.8mg)、90%メタノール画分300mL(シコタンソウ画分1E、10.6mg)、メタノール画分300mL(シコタンソウ画分1F、8.7mg)を得た。うち、40%メタノール画分(シコタンソウ画分1C)は、NMRスペクトルにより、その主成分はユキノシタ属タンニンであった[図15]。

10

【0046】

シコタンソウ画分1CについてHPLC(ポンプ:8.0mL/min、カラム:TOSOH ODS-120T, 21.5mm I.D.×300mm、検出:紫外吸収210nm)で精製を行った。溶出溶媒には20%アセトニトリル/水(0.2%トリフルオロ酢酸添加)から30%アセトニトリル/水(0.2%トリフルオロ酢酸添加)に至る濃度勾配をつけた組成を用いた。クロマトグラムの形状によって分画し、溶出液を濃縮乾固することで合計6種類の分画フラクション(画分シコタンソウ画分2A~2F)、即ち、シコタンソウ画分2A~2D(合計140.4mg)、シコタンソウ画分2E(7.5mg)、シコタンソウ画分2F(2.4mg)を得た。シコタンソウ画分2EはNMRスペクトルよりユキノシタ属タンニンであった[図16]。

20

【0047】

・ユキノシタクリーム の作製

ユキノシタ(株式会社小島漢方)450gをアセトン-水(4:1)の混合液に浸漬し、成分を抽出した。抽出液を留去して乾固させ、粗抽出エキス(117.2g)とした。次にこれを水に溶解させて、スチレン-ジビニルベンゼン系合成吸着剤樹脂である三菱化学Diaion HP-20樹脂(1L)を担体に用いたオープンカラムに付し、クロマトグラフィーによって分画した。溶出は次のメタノールと水の混合液を用いて順次行い、濃縮乾固することで括弧内の重量の各分画フラクション(クリーム用ユキノシタ画分1A~1F)、即ち、水画分2L(クリーム用ユキノシタ画分1A、71g)、20%メタノール画分2L(クリーム用ユキノシタ画分1B、2.9g)、40%メタノール画分2L(クリーム用ユキノシタ画分1C、5.7g)、60%メタノール画分2L(クリーム用ユキノシタ画分1D、14.6g)、90%メタノール画分1L(クリーム用ユキノシタ画分1E、2.5g)、メタノール画分1L(クリーム用ユキノシタ画分1F、405mg)を得た。続いてクリーム用ユキノシタ画分1D(500mg)を1.5gのグリセロールに溶解させ、更にそれに白色ワセリンを加えてホモジナイザーで混合し、クリーム用ユキノシタ画分1Dを5%(w/w)含有するクリームを調整した。また、クリーム用ユキノシタ画分1D(500mg)を500mgのグリセロールに溶解させ、更にそれらに白色ワセリンを加えてホモジナイザーで混合し、クリーム用ユキノシタ画分1Dを10%(w/w)含有するクリームを調整した。

30

40

【0048】

・ウイルス、細胞

本実験において対象としたウイルスは、新型コロナウイルス[元株(A系統):2019-nCoV/Japan/TY/WK-521/2020株、アルファ株(B.1.1.7系統):hCoV-19/Japan/QHN001/2020株、ベータ株(B.1.351系統):hCoV-19/Japan/TY8-612-P1/2021株、ガンマ株(P.1系統):hCoV-19/Japan/TY7-501/2021株、デルタ株(B.1.617.2系統):hCoV-19/Japan/TY11-927-P1/2021株、オミクロン株(BA.1系統):hCoV-19/Japan/TY38-873P0/2021株]、H1N1亜型A型インフルエンザウイ

50

ルス [A/Puerto Rico/8/1934株]、猫カリシウイルス [F9株]、マウスノロウイルス [S9株] である。なお、新型コロナウイルスについては以降の記載にて株名の特段の表記が無い場合は元株のことを指す。各ウイルスを任意のウイルス力価になるよう希釈する際にはリン酸緩衝液を用いた。新型コロナウイルスはVeroE6/TMPRSS2細胞、A型インフルエンザウイルスはMDCK細胞、猫カリシウイルスはCRFK細胞、マウスノロウイルスはRAW264細胞へそれぞれ感染させた。

【0049】

・ユキノシタ属抽出物を含む溶液のウイルス不活化活性評価方法

上述の様に作製した各ユキノシタ属抽出物を含む溶液を最終濃度が $25\mu\text{g}/\text{mL}$ または $100\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう新型コロナウイルス液、A型インフルエンザウイルス液、猫カリシウイルス液 [ウイルス力価： $3.25-5.25\log_{10}50\%$ 組織培養感染量 (TCID₅₀)/mL] とそれぞれ混合し、10秒または1分間反応させたのち培養細胞へ混合液を接種した。或いは、各抽出物を含む溶液を最終濃度が $100\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようマウスノロウイルス液 (ウイルス力価： $4.25-4.75\log_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$) と混合し、1分間反応させたのち培養細胞へ混合液を接種した。なお、対照群としてウイルス不活化活性を有さないジメチルスルホキシド (DMSO; 各抽出物の溶媒) とウイルス液を混合した群も置いた。

【0050】

その後、培養細胞上で混合液の10倍階段希釈を行い、 37°C のCO₂インキュベーター内で3日間培養した。その後、顕微鏡でウイルス感染・増殖に起因する細胞変性効果を観察し、それをもとにベレンスケルバー法を用いてウイルス力価 (TCID₅₀/mL) を算出しDMSOコントロール群のウイルス力価と各抽出物群のウイルス力価の差を比較することで各抽出物によるウイルス不活化の程度を評価した。

【0051】

・ユキノシタ属抽出物を含むクリーム of the ウイルス不活化活性評価方法

上述の様に精製したクリーム用ユキノシタ画分1Dを5%または10% (w/w) 含有するクリーム10mgを 2.25cm^2 ($1.5\text{cm} \times 1.5\text{cm}$) のポリエチレンテレフタレートフィルム上に塗布した。なお、対照群として有効成分を含まない基剤クリームをフィルムへ塗布した。続いて $60\mu\text{L}$ の新型コロナウイルス液、A型インフルエンザウイルス液、猫カリシウイルス液、マウスノロウイルス液 [ウイルス力価： $4.00-5.00\log_{10}\text{TCID}_{50}/60\mu\text{L}$] をポリスチレン製プレート上に滴下し、その上にクリーム塗付面がウイルス液と接するようにフィルムで覆った。 22°C で10分間反応させた後にウイルス液を回収し培養細胞へ添加した。その後、培養細胞上でウイルス液の10倍階段希釈を行い、 37°C のCO₂インキュベーター内で1時間培養した。その後培養液を入れ替え更に 37°C のCO₂インキュベーター内で3日間培養した。その後、顕微鏡でウイルス感染・増殖に起因する細胞変性効果を観察し、それをもとにベレンスケルバー法を用いてウイルス力価 (TCID₅₀/mL) を算出した。対照群のウイルス力価と各濃度のユキノシタ画分1D群のウイルス力価の差を比較することで、各濃度のユキノシタ画分1D含有クリームによるウイルス不活化の程度を評価した。

【0052】

・ユキノシタ属抽出物を含む溶液のウイルス不活化活性評価結果

各ユキノシタ属由来の粗抽出エキスを含有溶液 ($100\mu\text{g}/\text{mL}$) と新型コロナウイルス液またはA型インフルエンザウイルス液を混合し1分間反応させた結果、ユキノシタ、ダイモンジソウ、シコタンソウ、ジンジソウ由来粗抽出エキス群においてDMSOコントロール群と比較して統計学的に有意なウイルス力価の低下が認められた。その結果は [表1] および [表2] に示す。また、各ユキノシタ属由来の粗抽出エキスを含有溶液 ($100\mu\text{g}/\text{mL}$) と猫カリシウイルス液を混合し1分間反応させた結果、ユキノシタ、ダイモンジソウ、シコタンソウ、ハルユキノシタ、ジンジソウ由来粗抽出エキス群においてDMSOコントロール群と比較して統計学的に有意なウイルス力価の低下が認められた [表3]。

【表 1】

標的ウイルス：新型コロナウイルス，サンプル濃度：100 $\mu\text{g/mL}$

サンプル名	[DMSOコントロール ^{#)} - サンプル ^{#)}] $\pm$ 標準偏差 (ウイルス不活化率)
	反応時間 1分
ユキノシタ粗抽出エキス	$\geq 2.75 \pm 0.65^{**}$ ($\geq 99.822\%$)
ダイヤモンドソウ粗抽出エキス	$\geq 3.38 \pm 0.63^{**}$ ($\geq 99.958\%$)
シコタンソウ粗抽出エキス	$\geq 3.38 \pm 0.63^{**}$ ($\geq 99.958\%$)
ハルユキノシタ粗抽出エキス	$0.38 \pm 0.63^{\text{NS}}$
ジンジソウ粗抽出エキス	$\geq 3.00 \pm 0.71^{**}$ ($\geq 99.900\%$)

#) ウイルス力価： $\log_{10}$ TCID₅₀/mL

統計解析：Student's *t* test; $^{**}p < 0.01$, $^{\text{NS}}$ 統計学的な有意差なし

【表 2】

20

標的ウイルス：A型インフルエンザウイルス，サンプル濃度：100 $\mu\text{g/mL}$

サンプル名	[DMSOコントロール ^{#)} - サンプル ^{#)}] $\pm$ 標準偏差 (ウイルス不活化率)
	反応時間 1分
ユキノシタ粗抽出エキス	$\geq 1.25 \pm 0.29^{**}$ ($\geq 94.377\%$)
ダイヤモンドソウ粗抽出エキス	$\geq 1.50 \pm 0.29^{**}$ ($\geq 96.838\%$)
シコタンソウ粗抽出エキス	$\geq 2.13 \pm 0.25^{***}$ ($\geq 99.259\%$)
ハルユキノシタ粗抽出エキス	$0.13 \pm 0.25^{\text{NS}}$
ジンジソウ粗抽出エキス	$\geq 1.25 \pm 0.29^{**}$ ($\geq 94.377\%$)

#) ウイルス力価： $\log_{10}$ TCID₅₀/mL

統計解析：Student's *t* test; $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, $^{\text{NS}}$ 統計学的な有意差なし

【表 3】

標的ウイルス：猫カリシウイルス、サンプル濃度：100 $\mu\text{g/mL}$

サンプル名	[DMSOコントロール ^{#)} - サンプル ^{#)}] $\pm$ 標準偏差 (ウイルス不活化率)
	反応時間 1分
ユキノシタ粗抽出エキス	2.50 $\pm$ 0.58 ^{**} (99.684%)
ダイモンジソウ粗抽出エキス	2.00 $\pm$ 0.41 ^{**} (99.000%)
シコタンソウ粗抽出エキス	$\geq 2.75 \pm 0.50$ ^{**} ($\geq 99.822\%$)
ハルユキノシタ粗抽出エキス	0.75 $\pm$ 0.54 ^{**} (82.217%)
ジンジソウ粗抽出エキス	2.38 $\pm$ 0.48 ^{**} (99.583%)

#) ウイルス力価： $\log_{10}$ TCID₅₀/mL

統計解析：Student's *t* test; ^{**}*p* < 0.01

【0053】

次に粗抽出エキス以外の各ユキノシタ属抽出物を含む溶液（25 $\mu\text{g/mL}$ ）と新型コロナウイルス（元株）液を混合し10秒間反応させた結果、ユキノシタ画分1C・1D、ダイモンジソウ画分1C・1D、シコタンソウ画分1C、ハルユキノシタ画分1C・1D、ジンジソウ画分1C・1D、およびユキノシタ属タンニン画分（ユキノシタ画分2R、ダイモンジソウ画分2H、ダイモンジソウ画分3G、ハルユキノシタ画分2E+3F、ジンジソウ画分2E+3F）群においてDMSOコントロール群と比較して統計学的に有意なウイルス力価の低下が認められた。その結果は〔表4〕に示す。また、元株以外の新型コロナウイルス変異株（アルファ株、ベータ株、ガンマ株、デルタ株、オミクロン株）に対するユキノシタ画分1C・1D・2R（25 $\mu\text{g/mL}$ ）の10秒間における不活化活性を評価したところ、これら変異株に対しても統計学的に有意なウイルス力価の低下が認められた。その結果は〔表5〕に示す。

20

30

【表 4】

標的ウイルス：新型コロナウイルス，サンプル濃度：25 $\mu\text{g/mL}$

サンプル名	[DMSOコントロール ^{#)} - サンプル ^{#)}] $\pm$ 標準偏差 (ウイルス不活化率)
	反応時間 10秒
ユキノシタ画分 1 C	$\geq 4.00 \pm 0.00^{***}$ ($\geq 99.990\%$)
ユキノシタ画分 1 D	$\geq 3.50 \pm 0.50^{**}$ ($\geq 99.968\%$)
ダイモンジソウ画分 1 C	$\geq 3.56 \pm 0.38^{***}$ ($\geq 99.972\%$)
ダイモンジソウ画分 1 D	$\geq 3.81 \pm 0.13^{***}$ ($\geq 99.985\%$)
シコタンソウ画分 1 C	$\geq 3.75 \pm 0.50^{***}$ ($\geq 99.982\%$)
ハルユキノシタ画分 1 C	$1.88 \pm 0.63^{**}$ (98.682%)
ハルユキノシタ画分 1 D	$2.38 \pm 0.63^{**}$ (99.583%)
ジンジソウ画分 1 C	$\geq 3.56 \pm 0.38^{***}$ ($\geq 99.972\%$)
ジンジソウ画分 1 D	$\geq 3.50 \pm 0.68^{**}$ ($\geq 99.968\%$)
ユキノシタ画分 2 R (ユキノシタ属タンニン画分)	$\geq 3.13 \pm 0.25^{***}$ ($\geq 99.926\%$)
ダイモンジソウ画分 2 H (ユキノシタ属タンニン画分)	$\geq 2.88 \pm 0.25^{***}$ ($\geq 99.868\%$)
ダイモンジソウ画分 3 G (ユキノシタ属タンニン画分)	$\geq 3.00 \pm 0.41^{***}$ ($\geq 99.900\%$)
ハルユキノシタ画分 2 E + 3 F (ユキノシタ属タンニン画分)	$\geq 2.88 \pm 0.25^{***}$ ($\geq 99.868\%$)
ジンジソウ画分 2 E + 3 F (ユキノシタ属タンニン画分)	$\geq 2.75 \pm 0.29^{***}$ ($\geq 99.822\%$)

#) ウイルス力価： $\log_{10}$ TCID₅₀/mL

統計解析：Student's *t* test; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

【表 5】

標的ウイルス：新型コロナウイルス，サンプル濃度：25 $\mu\text{g/mL}$

サンプル名	標的変異株	[DMSOコントロール ^{#)} - サンプル ^{#)}] $\pm$ 標準偏差 (ウイルス不活化率)
		反応時間 10秒
ユキノシタ画分 1 C	アルファ株	$\geq 3.00 \pm 0.71^{***}$ ($\geq 99.900\%$)
	ベータ株	$\geq 3.63 \pm 0.48^{***}$ ($\geq 99.977\%$)
	ガンマ株	$\geq 4.63 \pm 0.48^{***}$ ($\geq 99.998\%$)
	デルタ株	$\geq 3.75 \pm 0.65^{**}$ ($\geq 99.982\%$)
	オミクロン株	$\geq 2.81 \pm 0.60^{***}$ ($\geq 99.845\%$)
ユキノシタ画分 1 D	アルファ株	$\geq 3.50 \pm 0.54^{***}$ ($\geq 99.968\%$)
	ベータ株	$\geq 3.88 \pm 0.48^{**}$ ($\geq 99.987\%$)
	ガンマ株	$\geq 4.38 \pm 0.48^{***}$ ($\geq 99.996\%$)
	デルタ株	$\geq 3.50 \pm 0.58^{**}$ ($\geq 99.968\%$)
	オミクロン株	$\geq 2.69 \pm 0.53^{***}$ ($\geq 99.796\%$)
ユキノシタ画分 2 R	アルファ株	$\geq 3.88 \pm 0.44^{***}$ ($\geq 99.987\%$)
	ベータ株	$\geq 4.00 \pm 0.00^{***}$ ($\geq 99.990\%$)
	ガンマ株	$\geq 4.63 \pm 0.25^{***}$ ($\geq 99.998\%$)
	デルタ株	$\geq 3.63 \pm 0.25^{***}$ ($\geq 99.998\%$)
	オミクロン株	$\geq 3.56 \pm 0.42^{***}$ ($\geq 99.973\%$)

#) ウイルス力価: $\log_{10}$ TCID₅₀/mL

統計解析: Student's *t* test; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

【0054】

また、粗抽出エキスを除く各ユキノシタ属抽出物を含む溶液（25 $\mu\text{g/mL}$ ）とA型インフルエンザウイルス液を混合し10秒間反応させた結果、ユキノシタ画分1C・1D、ダイモンジソウ画分1C・1D、シコタンソウ画分1C、ハルユキノシタ画分1C、ジンジソウ画分1C・1D、およびユキノシタ属タンニン画分（ユキノシタ画分2R、ダイモンジソウ画分2H、ダイモンジソウ画分3G、ハルユキノシタ画分2E+3F、ジンジソウ画分2E+3F）群においてDMSOコントロール群と比較して統計学的に有意なウイルス力価の低下が認められた。その結果は「表6」に示す。

【表 6】

標的ウイルス： A 型インフルエンザウイルス、 サンプル濃度： 25 $\mu\text{g/mL}$

サンプル名	[DMSOコントロール ^{#)} - サンプル ^{#)}] $\pm$ 標準偏差 (ウイルス不活化率)
	反応時間 10秒
ユキノシタ画分 1 C	$\geq 2.50 \pm 0.58^{**}$ ($\geq 99.684\%$)
ユキノシタ画分 1 D	$\geq 1.88 \pm 0.75^*$ ($\geq 98.682\%$)
ダイモンジソウ画分 1 C	$1.25 \pm 0.65^*$ (94.377%)
ダイモンジソウ画分 1 D	$\geq 1.88 \pm 0.48^{**}$ ($\geq 98.682\%$)
シコタンソウ画分 1 C	$\geq 1.88 \pm 0.48^{**}$ ($\geq 98.682\%$)
ハルユキノシタ画分 1 C	$0.50 \pm 0.29^{**}$ (68.377%)
ハルユキノシタ画分 1 D	-0.13 ± 0.25^{NS}
ジンジソウ画分 1 C	$\geq 2.00 \pm 0.71^*$ ($\geq 99.000\%$)
ジンジソウ画分 1 D	$1.75 \pm 0.29^{**}$ (98.222%)
ユキノシタ画分 2 R (ユキノシタ属タンニン画分)	$\geq 3.00 \pm 0.00^{***}$ ($\geq 99.900\%$)
ダイモンジソウ画分 2 H (ユキノシタ属タンニン画分)	$\geq 2.63 \pm 0.25^{***}$ ($\geq 99.766\%$)
ダイモンジソウ画分 3 G (ユキノシタ属タンニン画分)	$\geq 2.63 \pm 0.25^{***}$ ($\geq 99.766\%$)
ハルユキノシタ画分 2 E + 3 F (ユキノシタ属タンニン画分)	$\geq 2.63 \pm 0.25^{***}$ ($\geq 99.766\%$)
ジンジソウ画分 2 E + 3 F (ユキノシタ属タンニン画分)	$\geq 2.63 \pm 0.25^{***}$ ($\geq 99.766\%$)

#) ウイルス力価： $\log_{10}$ TCID₅₀/mL

統計解析： Student's *t* test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ^{NS}統計学的な有意差なし

【 0 0 5 5 】

また、粗抽出エキス以外の各ユキノシタ属抽出物を含む溶液（25 $\mu\text{g/mL}$ ）と猫カリシウイルス液を混合し10秒間反応させた結果、ユキノシタ画分1C・1D、ダイモンジソウ画分1C・1D、シコタンソウ画分1C、ハルユキノシタ画分1C・1D、ジンジソウ画分1C・1D、およびユキノシタ属タンニン画分(ユキノシタ画分2R、ダイモンジソウ画分2H、ダイモンジソウ画分3G、ハルユキノシタ画分2E+3F、ジンジソウ画分2E+3F)群においてDMSOコントロール群と比較して統計学的に有意なウイルス力価の低下が認められた。その結果は「表 7」に示す。

【表 7】

標的ウイルス：猫カリシウイルス、サンプル濃度：25 $\mu\text{g/mL}$

サンプル名	[DMSOコントロール ^{#)} - サンプル ^{#)}] $\pm$ 標準偏差 (ウイルス不活化率)
	反応時間 10秒
ユキノシタ画分 1 C	1.63 $\pm$ 0.48 ^{**} (97.656%)
ユキノシタ画分 1 D	1.75 $\pm$ 0.29 ^{**} (98.222%)
ダイモンジソウ画分 1 C	1.63 $\pm$ 0.63 [*] (97.656%)
ダイモンジソウ画分 1 D	1.75 $\pm$ 0.65 [*] (98.222%)
シコタンソウ画分 1 C	2.00 $\pm$ 0.50 [*] (99.000%)
ハルユキノシタ画分 1 C	1.38 $\pm$ 0.85 [*] (95.831%)
ハルユキノシタ画分 1 D	1.50 $\pm$ 0.41 ^{**} (96.838%)
ジンジソウ画分 1 C	1.50 $\pm$ 0.50 [*] (96.838%)
ジンジソウ画分 1 D	1.67 $\pm$ 0.29 ^{**} (97.862%)
ユキノシタ画分 2 R (ユキノシタ属タンニン画分)	2.50 $\pm$ 0.82 ^{***} (99.684%)
ダイモンジソウ画分 2 H (ユキノシタ属タンニン画分)	2.38 $\pm$ 0.75 ^{**} (99.583%)
ダイモンジソウ画分 3 G (ユキノシタ属タンニン画分)	2.00 $\pm$ 0.71 [*] (99.000%)
ハルユキノシタ画分 2 E + 3 F (ユキノシタ属タンニン画分)	2.13 $\pm$ 1.11 [*] (99.259%)
ジンジソウ画分 2 E + 3 F (ユキノシタ属タンニン画分)	2.00 $\pm$ 0.71 [*] (99.000%)

#) ウイルス力価：log₁₀ TCID₅₀/mL

統計解析：Student's *t* test; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001

【0056】

また、粗抽出エキス以外の各ユキノシタ属抽出物を含む溶液（100 $\mu\text{g/mL}$ ）とマウスノロウイルス液を混合し1分反応させた結果、ユキノシタ画分 1 C・1 D、ダイモンジソウ画分 1 C・1 D、シコタンソウ画分 1 C、ハルユキノシタ画分 1 C・1 D、ジンジソウ画分 1 C、およびユキノシタ属タンニン画分（ユキノシタ画分 2 R、ダイモンジソウ画分 2 H、ダイモンジソウ画分 3 G、ハルユキノシタ画分 2 E + 3 F、ジンジソウ画分 2 E + 3 F）群においてDMSOコントロール群と比較して統計学的に有意なウイルス力価の低下が認められた。その結果は「表 8」に示す。

【表 8】

標的ウイルス：マウスノロウイルス、サンプル濃度：100 μ g/mL

サンプル名	[DMSOコントロール ^{#)} - サンプル ^{#)}] $\pm$ 標準偏差 (ウイルス不活化率)
	反応時間 1分
ユキノシタ画分 1 C	1.25 $\pm$ 0.50* (94.377%)
ユキノシタ画分 1 D	1.50 $\pm$ 0.71* (96.838%)
ダイヤモンドソウ画分 1 C	1.13 $\pm$ 0.48 [†] (92.587%)
ダイヤモンドソウ画分 1 D	1.63 $\pm$ 0.48** (97.656%)
シコタンソウ画分 1 C	1.00 $\pm$ 0.00*** (90.000%)
ハルユキノシタ画分 1 C	0.44 $\pm$ 0.42* (63.692%)
ハルユキノシタ画分 1 D	0.44 $\pm$ 0.42* (63.692%)
ジンジソウ画分 1 C	1.38 $\pm$ 0.85* (95.831%)
ジンジソウ画分 1 D	0.69 $\pm$ 0.92 ^{NS}
ユキノシタ画分 2 R (ユキノシタ属タンニン画分)	1.75 $\pm$ 0.29** (98.222%)
ダイヤモンドソウ画分 2 H (ユキノシタ属タンニン画分)	2.00 $\pm$ 0.58** (99.000%)
ダイヤモンドソウ画分 3 G (ユキノシタ属タンニン画分)	1.88 $\pm$ 0.48** (98.682%)
ハルユキノシタ画分 2 E + 3 F (ユキノシタ属タンニン画分)	1.63 $\pm$ 0.63* (97.656%)
ジンジソウ画分 2 E + 3 F (ユキノシタ属タンニン画分)	1.38 $\pm$ 0.63* (95.831%)

#) ウイルス力価：log₁₀ TCID₅₀/mL

統計解析：Student's *t* test; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, ^{NS}統計学的な有意差なし

【0057】

これらの結果から、ユキノシタ属タンニンを含むユキノシタ属抽出物は極めて短時間でエンベロープを有さないウイルス及びエンベロープを有するウイルスの両者を不活化できることが示された。

【0058】

・ユキノシタ属抽出物を含むクリームの新型コロナウイルス不活化活性評価結果

クリーム用ユキノシタ画分 1 D を 5 % または 10 % 含有するクリームと各種病原ウイルス液を 10 分間反応させた結果、基剤クリーム群と比較してクリーム用ユキノシタ画分 1 D (5 % および 10 %) 群においてウイルス力価が統計学的に有意に低下していた。新型コロナウイルスに対しては濃度依存的なウイルス不活化活性が認められ、5 % 群では 99.58 % 以上、また 10 % 群では 99.87 % 以上のウイルスの不活化が認められた。A 型インフルエンザウイルスに対しては 5 % および 10 % 群において共に 99.90 % 以上のウイルスの不活化が認められた。猫カリシウイルスに対しては 5 % および 10 % 群において共に 99.76 % 以上のウイルスの不活化が認められ、ウイルス力価は殆ど検出限界以下となっていた。マウスノロウイルスにおいては 5 % 群では 98.67 % 以上、また 10 % 群では 99.00 % 以上のウイルスの不活化が認められた。その結果は [図 17] に示す。この結果から、ユキノシタ属タンニンを含むユキノシタ属抽出物を含有するクリームは各種病原ウイルスを不活化できることが示された。

【0059】

・ユキノシタ属タンニンのウイルス不活化機序

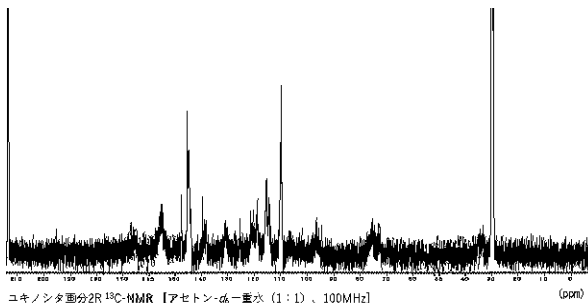
ユキノシタ属タンニンであるユキノシタ画分2 Rによるウイルス構造タンパク質への作用を評価した。陰性対照液DMSO（コントロール）またはユキノシタ画分2 Rで処理した各ウイルスについて構造タンパク質を標的としたウエスタンブロッティングを実施したところ、ユキノシタ画分2 R処理により標的タンパク質のバンドが減弱または消失するという結果が得られた〔図20〕。この結果は、ユキノシタ画分2 Rがウイルス構造タンパク質の破壊や構造異常を引き起こした可能性を示唆する。

【0060】

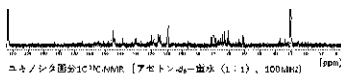
また、陰性対照液DMSO（コントロール）またはユキノシタ画分2 R処理した牛コロナウイルス（新型コロナウイルスの代替ウイルス）、A型インフルエンザウイルス、マウスノロウイルスのウイルス粒子構造を電子顕微鏡を用いて観察したところ、ユキノシタ画分2 R処理によるウイルス粒子の破壊や凝集が確認された〔図21〕。

10

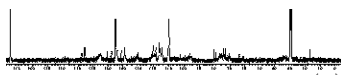
【図1】



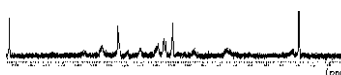
【図2】



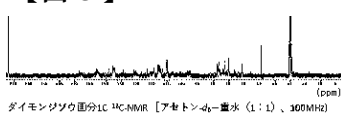
【図3】



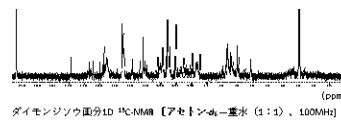
【図4】



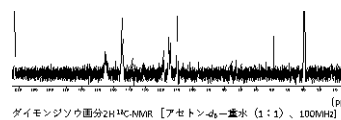
【図5】



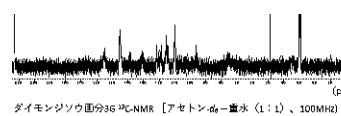
【図6】



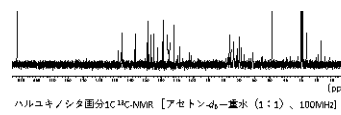
【図7】



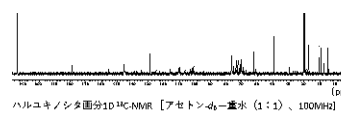
【図8】



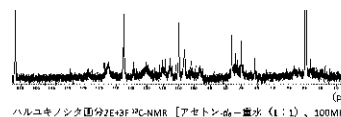
【図9】



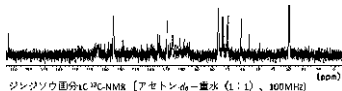
【図10】



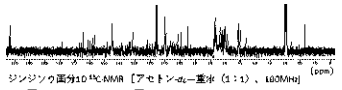
【図11】



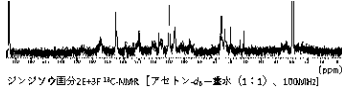
【図 12】



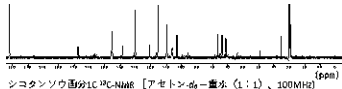
【図 13】



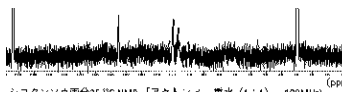
【図 14】



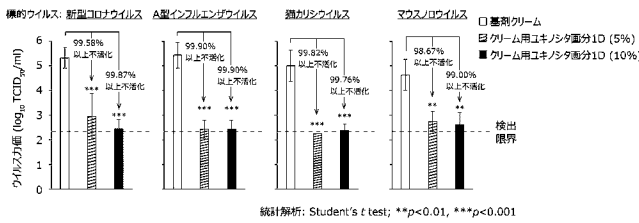
【図 15】



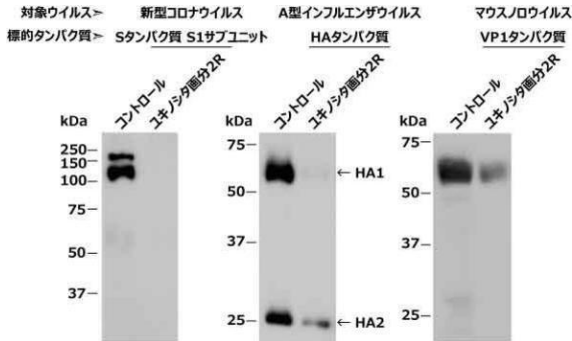
【図 16】



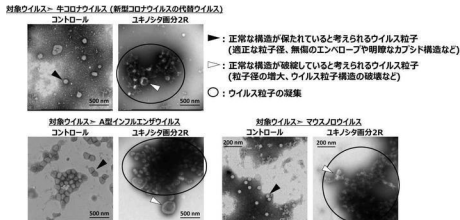
【図 17】



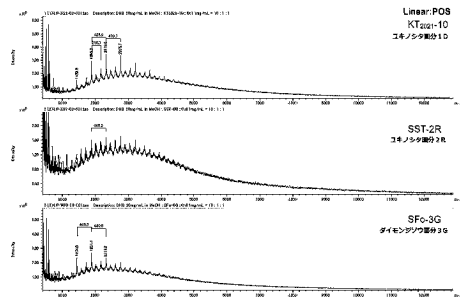
【図 20】



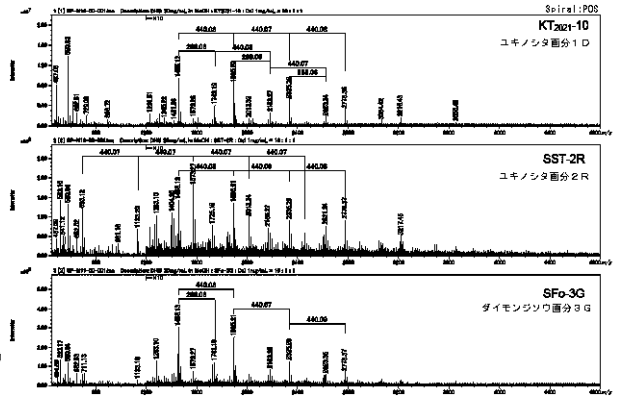
【図 21】



【図 18】



【図 19】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 31/16	(2006.01)	A 6 1 P 31/16	
A 6 1 P 31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12	

(72)発明者 小川 晴子
北海道帯広市稲田町西 2 線 1 1 番地 国立大学法人北海道国立大学機構帯広畜産大学内
F ターム(参考) 4C086 AA01 AA02 BA08 GA02 MA01 MA04 MA28 NA14 ZB33
4C088 AB66 AC01 BA08 BA19 BA24 BA25 BA32 CA08 CA14 MA28 NA14 ZB33
4H011 AA04 BB22