Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

On the mechanism of inactivation of chikungunya virus by tannic acid

小西, 英二

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1980-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲0310
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000310

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

〔15〕

氏名・(本籍)　小西英二（こにしえいじ）　（京都府）

学位の種類　医学博士

学位記番号　医博い第302号

学位授与の要件　学位規則第5条第1項該当

学位授与の日付　昭和55年3月31日

学位論文題目　**On the Mechanism of Inactivation of Chikungunya Virus by Tannic Acid**

タンニン酸によるチクングニアウイルス不活化作用の機序について

審査委員　主査　教授　堀田　進

教授　杉山武敏　教授　溝口史郎

論文内容の要旨

緒言

タンニンは，多数のフェノール性水酸基をもつ植物由来の化合物であり，タンパクを沈殿させる作用を有する。これは水素結合によるタンニンのタンパクへの結合の結果であり，また，タンニンのもつ酵素活性阻害，膜透過性低下，赤血球凝集（HA）などの作用も同様の機序によると考えられている。

一方，タンニンのウイルスに及ぼす作用は，抗ウイルス剤，下水・糞便処理剤への適用を目的として調べられ，*in vitro* でインフルエンザやヘルペスのウイルスの感染価，HA価を低下させることが報告されてきた。ところが，これらの現象に関与する機序については現在のところ明確でなく，また，トガウイルスに及ぼす作用についてはほとんど報告がない。我々は，トガウイルス科に属するアルファウイルスの一種であるチクングニアウイルス（CHIKV）を対象とし，加水分解型タンニンの一種であるタンニン酸（TA）の影響とその機序について検討した。

材料および方法

（1）CHIKV

BHK—21単層培養細胞で増殖させたウイルスが用いられた。プラク純化を3回繰り返したウイルスを，硫安塩析，分画遠心，プロタミン沈殿，ショ糖密度勾配遠心により精製した。精製 CHIKV から SDS－フェノール法により RNA を抽出し，また，トリトンX－100処理の後，ショ糖密度勾配遠心によりエンベロープを単離した。

（2）TAおよびタンナーゼ

粗製TA（大日本製薬）をエーテルで洗い，酢酸エチルで抽出した後，n－ヘキサン中に沈殿する分画を精製TA（nona－galloyl glucose，分子量1549）として実験に供した。タンナーゼ（タンニン分解酵素）は *Aspergillus oryzae* 由来の標品（三共）を用いた。

（3） CHIKV 不活化試験

CHIKV とTAの等量混合液の感染価をBHK細胞とメチルセルロース重層培地を用いたプラク法で，また，HA価をガチョウ赤血球を用いたマクロ法（pH 6.2）で測定した。感染性RNAはDEAE－デキストラン，または高張液を用いたプラク法で定量した。

（4） TA－CHIKV 結合比

TAとCHIKVの等量混合液を遠心後，上清のTA量をferric reagentで測定することにより，加えたタンパク量とそれによって沈殿したTA量の比を求めた。さらに比較のために，ウシ血清アルブミン（BSA），ゼラチン，プロタミン，グロブリンを供試した。

（5）電気泳動

試料をSDS，2－メルカプトエタノールで可溶化し，非連続緩衝液系SDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS－PAGE）を行った後，染色法によりタンパク帯を検出した。

（6）その他

細胞毒性試験はトリパンブルー染色法により，タンパク定量はLowry（1951）法により，また，電子顕微鏡観察は2％リンタングステン酸（pH 6.4）を用いたネガティブ染色法により行った。

結　果

（1） CHIKV 感染価に及ぼすTAの影響

CHIKV 感染価は加えたTAに伴って低下し，その作用曲線はpHにより異なった。pH 7.4ではCHIKV－TA混液に含まれるTAの1－20 nmoleの範囲内で，約4×10^9 PFUの感染価が約2×10^3 PFUへとほぼ直線的に低下したのに対し，pH 6.2では4－10 nmoleの比較的狭い範囲で同様の直線的低下が起こった。

CHIKV とTAを混合後，直ちに感染価を測定した場合でも，氷水中に1，2時間放置してから測定した場合でも，ウイルス阻害率はほぼ同じであった。また，混液の希釈率とプラク数は比例した。なお，この実験条件において，100 nmole以下のTAは，細胞毒性，細胞変性効果をほとんど示さなかった。

（2） CHIKV のHA価に及ぼすTAの影響

pH 6.2において，TAは CHIKV の感染価，HA価をほぼ同調的に低下させた。ただし，あるTA量以上ではTA自身のHA活性があらわれるため，V字型の作用曲線を描いた。

TA－CHIKV の混合比を100 nmole対2×10^9 PFUとすると，直ちに液は白濁し，電顕下でウイルス凝集像が観察された。この凝集塊を遠心沈殿させ，蒸留水で洗った後，$FeCl_{33}$を加えると黒紫色に変化した。これらの結果はTA分子の CHIKV 粒子への結合を示している。

HA活性をもつ2種の要素── TA，CHIKV ──が互いに結合することにより，有効分子数が

減少することを考えると，V字型作用曲線の極小点，すなわちHA活性を最低値にしうるTA量がCHIKVとの結合当量点であると推察される。この点におけるTA量（T）とCHIKV量（V）との関係は，

$$T = 1.1 \times 10^{-4} \times \sqrt{V}$$

であった。

（3） CHIKV－TA結合比

CHIKVと供試タンパクのすべてについて，加えたタンパク量が比較的少ない時，その全量がTAにより沈殿した。この場合，結合する両者の量は比例関係にあった。pH 3.0－9.0の範囲内で結合率を調べた結果，CHIKVと供試タンパクはそれぞれ反応しうる固有のpH域をもつことが明らかにされた。さらに，CHIKV以外の供試タンパクは，一定のpH範囲内で特有の結合率を示したが，これに反し，CHIKVは3種の異なった結合率を示した。

（4） CHIKVのRNA，エンベロープに及ぼすTAの影響

CHIKVより抽出したRNAの感染価も，pH 6.2，6.8，7.4においてTAにより低下した。TA処理RNAの吸収スペクトルを調べた結果，その最大吸収波長は未処理RNAのそれより大きかった。

TAはCHIKVエンベロープのHA価をも低下させ，V字型の作用曲線を描いた。両者の混液は白濁し，電顕下で凝集塊が観察された。また，この凝集塊は$FeCl_3$の添加により黒紫色を呈した。

（5） CHIKV構造タンパクに及ぼすTAの影響

無処理ウイルスのSDS－PAGE像には，3種のCHIKV構造タンパクが検出された。最も速く泳動するタンパクは分子量36,000でキャプシド由来と考えられ，他の2種類はそれぞれ分子量56,000，52,000でエンベロープ由来と考えられた（これらを順にC，E_1，E_2と名づけた）。TA処理ウイルスを泳動させるとE_1，E_2は対照無処理ウイルスと同様であったが，Cは検出されなかった。この可溶化試料を10日間室温に放置した後に泳動させると，E_1のほとんどが消失し，E_2のみが認められた。無処理ウイルスを可溶化後，結合当量のTAを加えた試料を直ちに泳動させたものは対照無処理試料と同様であったが，室温に2，4，10日間放置した試料のPAGE像はそれぞれ，Cの減少，Cの消失，E_1の減少が認められた。これらの結果は，TAのCHIKV構造タンパクに対する親和性が$C > E_1 > E_2$であることを示唆している。

（6） TA不活化CHIKVからの感染性の回復

pH 6.2のTA－CHIKV混液（白濁）をpH 9.0あるいは10.0にすると透明となり，pHを6.2にすると再び白濁した。このようなpH依存性の可逆反応は感染価についてもみられ，pH 6.2におけるCHIKV（4.4×10^{10} PFU）とTA（100 nmole）との混液の感染価は7.1×10^{3} PFUであったのに対し，そのpHを10.0にすると感染価は1.8×10^{10} PFUに回復した。しかし，BSA添加やタンナーゼ処理によっては，このような感染価の回復は認められなかった。

考察および結論

TAのCHIKV不活化作用は，まず，TA分子がCHIKV粒子表面のエンベロープタンパク，

特にE_1に結合し，次いで，TAの架橋作用によりCHIKV粒子が凝集したために起こったと考えられる。TAは単離したキャプシドタンパクCやRNAにも作用したが，CHIKV不活化に際しては粒子表面タンパクとの接触が先行するため，ヌクレオキャプシドへの作用が主たる原因とは考えられない。

タンニンとタンパクの結合力は，結合に関与する部分の分子構造などに依存して変化し，同時に，ウイルス不活化作用にも変化をもたらすと考えられる。文献上，用いたタンニンとウイルスの組合せにより不活化の程度は種々である。本実験のTAは，CHIKV構造タンパクの中でCに最も強い親和性を示し，次いでE_1，E_2の順であった。また，TAはCHIKVと4種の供試タンパクに対して異なった結合比，並びに結合可能なpH域をもつことが明らかにされた。これらの差異は，タンパクの等電点や含有糖量などに依存した結合力の違いに基いていると考えられる。

TAによりいったん不活化されたウイルスが再び活性を回復する現象についても，両者の組合せにより異なった結果が報告されている。従来，タンニンのタンパクへの結合は非特異的と考えられ，HA反応などに利用されてきたが，上記の結果はいずれもタンニン－タンパク結合の特異性を示している。このような特異性を解明することは，ウイルスタンパクを研究する上に有力な武器の一つとなることが示唆され，今後さらに追求の価値がある。

論文審査の結果の要旨

タンニンは蛋白質に結合してそれを沈殿させる作用を有することは古くから知られており，ウイルスに対してもこれを失活させることが報告されている。しかし，この現象に関与する機序については現在なお充分明らかになっておらず，検討の対象となったウイルスの種類も比較的限られたものである。一方，チクングニアウイルス（以下CHIKVと略記）はトガウイルス科に属するアルファウイルスの一種であり，ヒトに熱性疾患を起さしめ，特にアフリカ，東南アジア等の熱帯地域において出血熱の原因と目されているウイルスである。しかし，その生物物理化学的性状についてはあまり明らかにされておらず，検討の余地が大きく残されている。申請者はタンニンとCHIKVとの結合を詳細にしらべることによってタンニンの生物学的作用の機序及びCHIKVの基礎的性状の一端を解明せんと志した。

実験材料及び実験方法

CHIKVハムスタ腎臓由来株細胞（BHK－21）の培養で増殖させたウイルスが用いられた。プラク純化を数回くりかえしたウイルスを硫安塩析，プロタミン沈澱，蔗糖密度勾配遠心の組合せにより精製した。精製CHIKVからSDSフェノール法によりRNAを抽出し，トリトンX－100処理によってエンベローブを単離した。また，試料を非連続緩衝液系SDS・ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動（SDS－PAGE）によってウイルスの蛋白を分画した。電子顕微鏡観察を適宜行って形態学的な裏付所見を得ることにつとめた。

ウイルスの感染性はBHK細胞とメチルセルローズ重層培地を用いたプラク法により，血球凝集価

（HA）はガチョウ赤血球を用いたマクロ法により，また感染性 RNA は DEAE デキストランあるいは高張NaCl を用いたプラク法でそれぞれ定量した。

タンニン酸（TA）およびタンナーゼ：粗製タンニンを，エーテル，酢酸エチール，n－ヘキサンで順次処理して精製しnona－galloyl glucose（分子量 1549）として実験に供した。タンナーゼは Aspergillus oryzae 由来の標品を用いた。タンニンの定量は Ferric reagent を用いて行った。ウイルス蛋白との比較のためにウシ血清アルブミン，ゼラチン，プロタミン，グロブリンを供試した。

実験成績：得られた成績を要約すると次の通りである。

1. TAは精製ウイルスに結合してその感染性を失わせた。その失活作用は pH 依存性であり，またウシ血清アルブミンによって阻害された。結合当量点における TA（T）と CHIKV（V）との関係は　$T = 1.1 \times 10^{-4} \times \sqrt{V}$

   で表わされることを示した。TA－CHIKVの結合は可逆性であり pH 6.2 において結合が起ってウイルス感染性が低下し，pH 10.0 において結合が解けウイルス感染性の回復することが知られた。TA と結合した CHIKV は凝集塊を形成することが電顕下で観察された。

2. CHIKV の構成蛋白として 3 種類が区別された。そのうち 1 種類は分子量 36,000 で，ウイルスのcoreに含まれ(これをCと名づけた),他の 2 種類はエンペロープに含まれそれぞれ分子量 56,000（これをE_1と名づけた），分子量52,000(これをE_2と名づけた)であった。これらはいづれも電子顕微鏡観察によって形態学的に確認された。因みに CHIKV エンペロープ蛋白が 2 種類に分かれることを確認したのは申請者が最初である。

3. 上記 3 種類の CHIKV 構成蛋白は TA に対しそれぞれ異った結合率を示した。種々条件を変えてその結合率をしらべた結果，TA 親和性は$C > E_1 > E_2$ の順であることが示された。RNAの感染価も pH 6.2－7.4 の範囲内において TA により低下した。TA はまたエンペロープの HA 価をも低下させ，TA 処理エンペロープは凝集塊を形成することが電顕下で観察された。

考察と結論

本研究は医学的にきわめて重要な病原体であるにかかわらず，その基礎的性状があまり明らかでなかったチクングニアウイルスについて，その粒子を精製し，それより感染性 RNA を抽出すると共に，構造蛋白の分画を行って，そのそれぞれと精製タンニン酸との結合の関係を詳細に検討したものである。タンニン酸結合の面から本ウイルスの生物学的性状の一端が明らかになった。その成績はさらに本ウイルスのもつ蛋白，核酸の意義を一層明確にし，ひいては本ウイルスの感染を抑制する手段の発見にも連なる可能性を示唆するものである。上記の知見のいくつかは，申請者が他に先がけて見出したものであり，本ウイルス研究の将来の発展にきわめて有意義なものと考えられ，医学博士の学位を授与するにふさわしい論文であると判定した。