



アルギニンによるウイルス不活化の増強

荒川 力¹・池田 敬子²・西出 充徳³・江島 大輔⁴・小山 一⁵

1. 要 約

ウイルスの不活化はバイオ医薬品の開発にとって不可欠の課題である。筆者らは酸性溶媒によるウイルス不活化効果がアルギニン添加によって顕著に増強されることを示してきた。ここではいくつかのウイルスの酸による不活化と、これに対するアルギニン添加の影響について紹介する。また抗ウイルス効果を持つ低分子有機化合物のウイルス不活化効果へのアルギニンの影響についても述べる。

2. 緒 言

人は常にウイルス感染の危険性にさらされている。しかし感染は必ずしも人から人へだけでなく、動物から人への可能性もある。たとえば最近、人への感染の可能性がある鳥インフルエンザが大きな社会問題となっている。それゆえウイルス感染の危険性を少しでも減少できれば社会的に大きな意義があり、効果的なウイルス不活化技術の開発が重要な課題となっている。

このようなウイルス感染は一般的な感染経路のみならず、人的事故によっても起こり得る。その典型的な例が過去に大きな社会問題となった非加熱血液製剤による肝炎ウイルス、HIVなどへの感染である。このような注射薬が危険なウイルスで汚染されていないことは必須の条件であり、現在はウイルス不活化のための加熱処理をした血液製剤が用いられている。

一方、バイオテクノロジーの進展により多くのタンパク質製剤が開発・使用されているが、これらのすべてが注射薬であり、その多くが動物由来の培養細胞を使って生産されている。この生産に使われる培養細胞がウイルスに感染している可能性があり、混入しているウイルスは精製過程で不活化ないし除去されなければならない。現在の主要技術は酸や界面活性剤処理によるウイルス不活化と、ウイルス除去膜による除去である。筆者らはアルギニンが酸によるウイルス不活化を促進することを見

いだし、その機構の解明や応用の研究を進めてきた¹⁻⁵⁾。また、アルギニンはウイルス不活化作用のある低分子化合物の効果を高めたり、その溶解度を増加させたりすることも見いだしてきた⁶⁻⁸⁾。アルギニンは天然アミノ酸で、その安全性については言うまでもない。弱酸性でもウイルス不活化効果が見られることから、人体での感染部位（たとえば呼吸器粘膜など表在感染部位）での応用の可能性が示唆された⁹⁾。

3. バイオ医薬品のウイルス不活化

バイオ医薬品の中心はタンパク質製剤である。1970年代に開発された遺伝子工学の技術により、多くのタンパク質を培養細胞を使って人工的に作る事が可能になった。すなわちヒトの遺伝子を培養細胞あるいは微生物に導入し、細胞を増殖させることで、大量のタンパク質を生産することが可能となった。遺伝子導入から、発現、精製を経てバイオ医薬品にいたる過程をチャートで示すと、図1のようになる。現在主に使用されている発現細胞は動物細胞か大腸菌を中心とする微生物である。動物細胞の場合、発現タンパク質は細胞外に分泌される

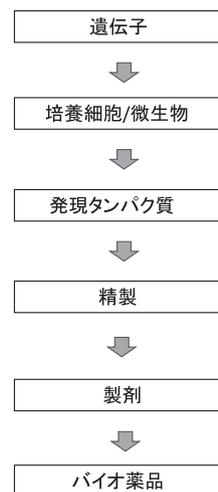


図1. バイオ医薬品生産過程のフローチャート

著者紹介 ¹Alliance Protein Laboratories E-mail: Tarakawa2@aol.com
²和歌山県立医科大学 保健看護学部 ³和歌山信愛女子短期大学生活文化学科 ⁴味の素アミノ酸研究所
⁵香川大学医学部分子細菌学

ことがほとんどである。分泌されたタンパク質を培養細胞由来の不純物から分離精製し、注射薬として使いやすく長期間貯蔵可能な製剤として開発するのが一般的な方法である。これに対し、大腸菌などの微生物を発現細胞に使った場合、ほとんどの発現タンパク質は菌体内に蓄積される。両発現方法にはそれぞれ利点、欠点があるが、動物細胞を使った場合の一つの大きな問題はウイルス混入の可能性である。

ウイルス性疾患での感染成立の確率は式1で表現できる。この式の分母である感染に対する抵抗力は、タンパク質製剤が投与される病人の方が健常人よりも劣っている場合が多いと考えられ、それだけ感染の確率が高くなる。ウイルスの感染力はウイルス固有の性質であり、変えることはできない。それゆえ、感染の確率を下げるには、ウイルスの総数を減らすか、ウイルスをより多く不活化するかのどちらかである。ウイルス総数を減らすには、いわゆるウイルス除去ナノフィルターが用いられる。感染の確率を下げるもう一つの方法が本解説の課題であるウイルス不活化である。ウイルス不活化には主に下に述べる三つの手段が用いられるが、それ以外にも高压処理や紫外線照射といった方法がとられることもある。一つ目は主に血液製剤に使用される加熱処理である。二つ目は界面活性剤の添加である。界面活性剤は膜脂質に損傷を与えることによりウイルスを不活化するので、脂質膜を持たないウイルスには効果がない。三つ目は酸処理である。酸処理でなぜウイルスが不活化するのか、詳細な機構は不明であるが、タンパク質の酸変性が関係しているものと思われる。多くのタンパク質では、酸によってその構造が変化する。ウイルスのタンパク質も同様な酸変性を起こし、感染力を失うものと思われる。

$$\frac{(\text{ウイルス総数} - \text{不活化ウイルス}) \times (\text{ウイルスの感染力})}{(\text{感染に対する抵抗力})} \quad (\text{式1})$$

3.1 酸性溶媒によるウイルス不活化 バイオ医薬品、特に抗体医薬の生産には、酸によるウイルス不活化が用いられる。抗体の場合、その精製には(すなわち図1の4段目において)抗体に特異的なプロテイン-A親和性クロマトグラフィーが使用されるためである。このクロマトグラフィーの特徴は分泌発現された抗体をプロテイン-Aに特異的に吸着させ、吸着した抗体を酸性条件で溶出することにある。すなわちその溶出条件下でウイルス不活化を達成できることになる。図2にHSV-1(単純ヘルペスウイルス1型)、HSV-2(単純ヘルペスウイルス2型)、IAV(インフルエンザウイルスA型)、PV-1(ポリオウイルス1型)の4種類の酸による不活化の一

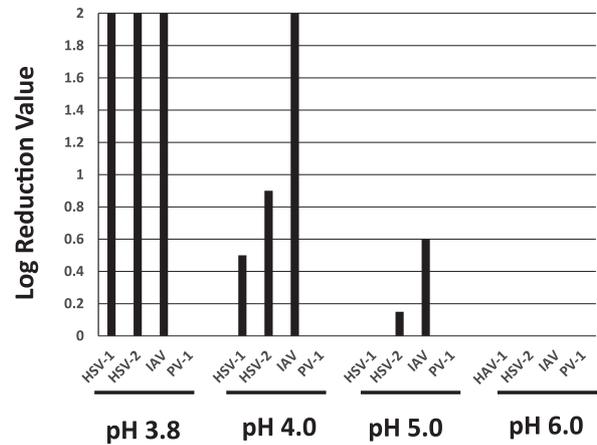


図2. 4種のウイルスの酸不活化。Log Reduction Value = Log(総ウイルス量/感染ウイルス量)。この値はウイルス不活化が強いほど大きくなる。

例を示す。これらのウイルスは、核酸の種類、脂質膜の有無、感染経路などが異なっている。図2は10 mMクエン酸、0.15 M塩化ナトリウム中でのいくつかのpHでのウイルス不活化の結果を示している。脂質膜を持たないPV-1はpH 3.8-6.0でまったく不活化されず、明らかに酸非感受性である。一方、pH 6.0では4種のウイルスのどれも不活化されない。pH 5.0ではIAVのみが若干(80%程度)不活化される。pH 4.0まで下げると、IAVは完全に、HSV-1、HSV-2も若干不活化されるようになる。すなわちHSV、IAVともに酸感受性であるが、IAVの方がその傾向が強い。その理由としてIAVの膜タンパク質、ヘマグルチニンの酸感受性が強いことが考えられる。pH 3.8ではこれら3種のウイルスの感染力は中性pHでの保存に比べて100分の1以下にまで不活化される。

この結果は上に述べたタンパク質の酸変性がPV-1では起こらない、あるいは、起こってもその感染力に影響しないことを意味している。前者の理由としてPV-1のタンパク質の酸安定性が高い可能性が考えられる。後者の理由として脂質膜を持つウイルスの不活化の場合、タンパク質の構造変化がタンパク質と脂質膜との相互作用に変化を誘引し、それがさらなる引き金となって、タンパク質の構造に不可逆的变化が起きてしまう可能性があるのに対し、脂質膜を持たないPV-1にはその可能性が存在しないことが考えられる。

IAVは明らかに酸感受性を示したが、その際の感染力の低下は単にpHによるものだけではない。図3に10 mMクエン酸でpHを5.0に調整した各種濃度の塩化ナトリウム溶液のインフルエンザウイルスA型の不活化効果を示した。塩化ナトリウム濃度の増加とともに若干不活化効果が弱まる傾向が見られる。この図にはpH 5に調

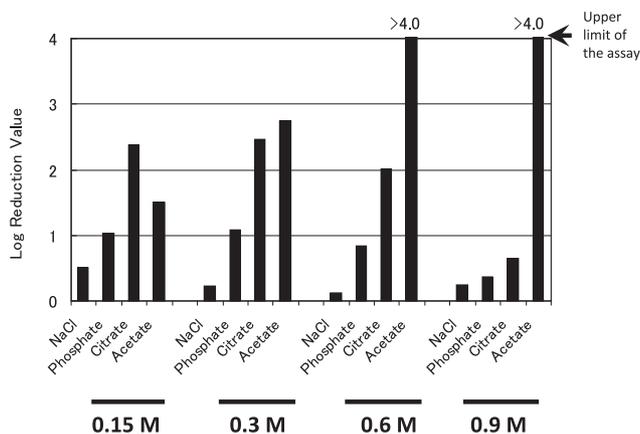


図3. インフルエンザウイルスA型の酸による不活化における異なる酸の効果。これらの酸のpHは苛性ソーダで調整した。

整したいいくつかの酸を0.15–0.9 M添加した結果も示している。この結果から酸による不活化にはpH以外の要因も寄与していることは明らかである。たとえば、0.15 Mではクエン酸がもっとも強い効果を示すが、0.9 Mでは酢酸がもっとも強い。酢酸はその他のpHでも、他の酸と比べて強い不活化効果を示す。0.9 Mの濃度では、クエン酸やリン酸は0.15–0.6 Mで顕著に認められた不活化効果をほとんどなくしてしまう。この結果は酸性pHとイオンの種類や濃度を選択することで、最大のウイルス不活化効果が得られる可能性を示唆している。

3.2 アルギニンによるウイルス不活化の増強

上記の結果から、ウイルス不活化はpHのみならず、イオンの影響を受けることが明瞭となった。タンパク質の変性がウイルス不活化の原因と考えられることから、変性を増強するものとしてまず、尿素などのタンパク質の変性剤や、SDSのような強い界面活性剤が考えられる。しかしこれらの添加物は、ウイルスタンパク質のみならず、生産目的とするタンパク質を変性させてしまう可能性がある。たとえば抗体医薬の場合、前述のように酸性処理をしてウイルス不活化をする時、酸の影響だけでも抗体を変性させてしまう可能性があり、そこにタンパク質を変性させる物質をさらに添加すると、抗体の変性が促進される可能性が大である。そこで筆者らが試みたのは、アルギニンがウイルス不活化を促進するかどうかである。それは筆者らが下記の通り、アルギニンがタンパク質に特徴的な影響を及ぼすことを見いだしてきたことによる。

1. タンパク質は酸や温度上昇などのストレスによって構造変化を起こすと会合しやすくなるが、アルギニンが共存していると、その会合が抑制される。アルギニンにはタンパク質の構造変化を抑制する作用はないので、この結果はアルギニンがタンパク質分子

間の相互作用を抑制することに起因しているものと考えられる。

2. 低分子有機化合物にはその疎水性ゆえに水に溶けにくいものがある。通常、それらの溶液を調製する場合、有機溶媒で溶かした後に生理食塩水などに希釈する方法がとられるが、しばしば生理活性物質が会合し、本来とは異なる活性を示すことが知られている。アルギニンはこれらの有機化合物、特に芳香環を持つものの溶解度を高めるので、有機溶媒ほどの可溶化効果がなくても安全な溶解剤として使える可能性がある。
3. タンパク質はカラムの充填材などの固相表面、特に疎水性表面に吸着しやすいが、アルギニンは顕著にそれを抑制する。
4. アルギニンにはタンパク質変性作用がない。

酸によるウイルス不活化が、タンパク質の構造変化に起因する分子間相互作用の変化によるものとする、アルギニンがその分子間相互作用の変化をさらに増強させることは前述の理由から十分に考えられる。実際アルギニンは酸と強い相乗効果を示す。図4にその一例を示す。0.1 Mクエン酸と0.7 Mアルギニンによるウイルス不活化を比較したものである。図3で示したように、クエン酸は高い濃度ではほとんどウイルス不活化効果を示さないで、この比較実験では0.1 Mクエン酸を用いた。実験に用いたHSV-1は、0.1 Mクエン酸によってpH 4.5と5.0では不活化されず、pH 4.0で100分の1程度に不活化される。これに反し、0.7 MアルギニンはpH 4.5でも10分の1程度までウイルス感染を減らすことができる。pH 4.0では検出限界までウイルスの感染価が下がる。

もう一つの例として、アルギニンのインフルエンザウイルスA型の不活化への影響について述べる。図5はpH 4.0での不活化の結果を示している。0.1 Mクエン酸は10分の1ほどまで感染価を下げる。0.7 M塩化ナトリウム（図5, NaCl）はそれより10倍ほど強い効果がある。

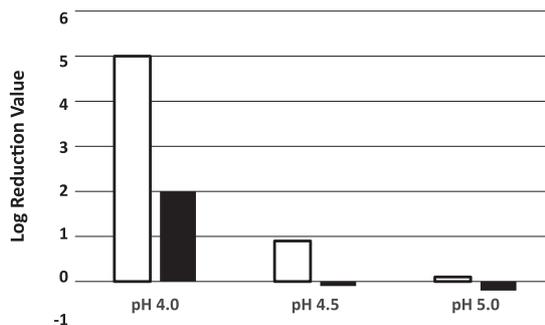


図4. 0.1 Mクエン酸（黒棒）と0.7 Mアルギニン（白棒）によるHSV-1の不活化

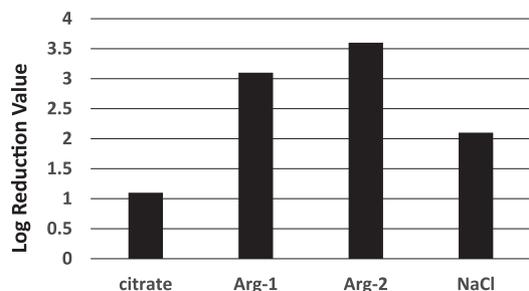


図5. 0.1 Mクエン酸, 0.35 Mアルギニン (Arg-2), 0.7 Mアルギニン (Arg-1), 0.7 M塩化ナトリウムによるpH 4でのインフルエンザA型の不活化.

アルギニンはさらにウイルスを不活化する. 0.35 M (Arg-2) と0.7 M (Arg-1) のアルギニンは1000分の1以下に感染ウイルス量を下げることができる.

3.3 アルギニンによる低分子化合物の持つウイルス不活化効果の増強

さらに興味をもたれるのは, 低分子化合物のウイルス不活化効果をアルギニンが増強させることである. コーヒーの成分であるカフェ酸は抗ウイルス活性を持ち, 細胞内のウイルス増殖を抑制するが, ウイルス不活化効果はほとんどない. 図6に示すようにHSV-1に対してカフェ酸はpH 4.5で10 mMまでPBSと比べてほとんど不活化効果を持たない. カフェ酸の溶解度は以下で述べるようにきわめて低い. カフェ酸は芳香環と酸性基を持っており, その解離定数は4.6付近にある. pH 4.5では半分程度の分子が(あるいは時間平均で半分の時間)負に帯電している. 電荷を持たない中性型のカフェ酸の溶解度はその疎水性ゆえにきわめて低く, pH 4.5でのカフェ酸の溶解度は10 mMほどである. したがって, 図6に示すように, 10 mM以上に上げてウイルス不活化効果はほとんど変化しない(黒丸).

アルギニンは酸性領域において1 Mで5倍以上, 2 Mで10倍以上カフェ酸の溶解度を高める. よってpH 4.5の1 Mアルギニン中では50 mMぐらゐのカフェ酸の溶解度が得られることになる. 図6には0.35 Mアルギニン存在下でのカフェ酸のウイルス不活化効果を示している. 0.35 Mアルギニン存在下でも6 mM以下ではカフェ酸のウイルス不活化効果はないが, それ以上の濃度では顕著な不活化効果を示す. 15 mMでは検出限界近くまで不活化効果が上がる. これは0.35 Mアルギニンの存在下でカフェ酸がより溶けるようになったことが主な理由として考えられるが, カフェ酸とアルギニンとの相乗効果の可能性も考えられる. たとえば図7に示すように, アルギニンがウイルス表面に変化をもたらし, それがカフェ酸の結合を強めること(B), あるいはカフェ酸単独では効果がないが, アルギニンとの共同作業でウイルス表面の変化が増加し(A), しいてはウイルス不活化が強

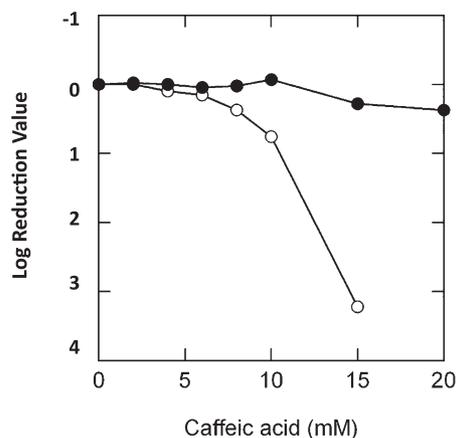


図6. カフェ酸によるHSV-1の不活化. 白丸は0.35 Mアルギニンが共存している.

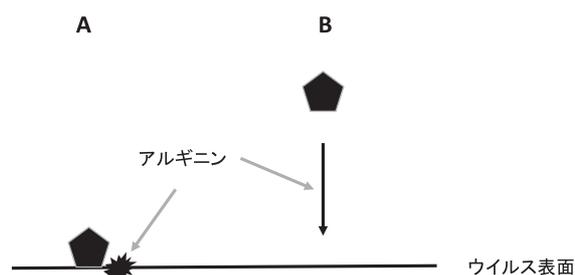


図7. アルギニンによるカフェ酸(五角形)のウイルス不活化効果の増強の模式図

まったこと, などが考えられる.

また, アルギニンは抗ウイルス活性のあるフェネチルエステル, エピカテキンガレートのウイルス不活化効果を向上させ, 同様の活性を持つオクチルガレートやアシクログアノシンの溶解度も高める. たとえば, オクチルガレートの水溶解度は0.07 mg/mlときわめて低い. 若干ではあるが0.5 Mアルギニンは1.6倍ほど, 1 Mアルギニンは2.2倍ほどその溶解度を上昇させる. アルギニンはアシクログアノシンに対しても似たような効果を示す.

4. 体表でのウイルス不活化

これまではバイオ医薬品に混入するウイルスの不活化について述べてきたが, このような不活化条件を消毒剤として応用できるであろうか. 通常用いられるアルコール系消毒剤は手などの皮膚に付着したウイルス不活化には有効であるが, 粘膜などの体表に付着したウイルス不活化には, 細胞毒性が強く使用することはできない. 弱酸性アルギニン溶液はそのような応用が可能であろうか. ヘルペス感染症の原因ウイルスであるHSV-1は弱酸性アルギニンに感受性であることはすでに記した. 筆

者らはモデル動物（ウサギ）の角膜に単純ヘルペス感染による角膜炎を起こさせる条件下で、弱酸性アルギニンによる発症阻止効果を調べたところ、顕著な効果が得られた。低分子抗ウイルス剤の大きな問題は耐性ウイルスの出現である。耐性ウイルスが生まれる機構は、主に抗ウイルス剤の標的分子を変異させ、その結合を阻止することにある。抗ウイルス薬分子は、特定のウイルスタンパクの決まった結合部位に、高い親和性を持って特異的に結合し、このタンパクを不活化することにより抗ウイルス活性を顕わす。それに対し、アルギニンは、それほど高い親和性を持たない分、非特異的に多くのウイルスタンパクに作用し、タンパク質分子との相互作用においてもタンパク質の多数の部位に非特異的に作用すると考えられることから、一つや二つのアミノ酸変異が導入されてもアルギニン耐性が顕われる可能性は考えられず、変異によってアルギニンの不活化効果を阻止することは不可能だと考えられる。したがって、アルギニンによるウイルス不活化は、耐性ウイルスを生み出す可能性がないと考えられるので、安全な感染予防法といえる。弱いウイルス不活化効果を示す天然の低分子化合物は多くあ

り、それらの効果をアルギニンによって増強できれば、安全で低価格のウイルス不活化剤の開発の可能性が高まるものと思われる。さらに、これまで消毒薬は、人体に対する組織障害性から死細胞で覆われた皮膚表面や環境表面の消毒には使えても、呼吸器や眼、性器などの粘膜表面には適用できないと考えられてきたが、アルギニンとの組合せでウイルス不活化（消毒活性）化合物を体表でのウイルス性表在感染症の予防薬や治療薬として適用できる新たな可能性が現実的なものとして考えられる。

文 献

- 1) Yamasaki, H. *et al.*: *J. Pharm. Sci.*, **97**, 3067 (2008).
- 2) Arakawa, T. *et al.*: *Biotechnol. J.*, **4**, 174 (2009).
- 3) Naito, T. *et al.*: *Int. J. Mol. Med.*, **23**, 495 (2009).
- 4) Tsujimoto, K. *et al.*: *Int. J. Mol. Med.*, **25**, 433 (2010).
- 5) Ikeda, K. *et al.*: *Exp. Ther. Med.*, **1**, 251 (2010).
- 6) Arakawa, T. *et al.*: *Curr. Med. Chem.*, **16**, 2485 (2009).
- 7) Hirano, A. *et al.*: *J. Phys. Chem. B.*, **114**, 13455 (2010).
- 8) Hirano, A. *et al.*: *J. Phys. Chem. B.*, **117**, 7518 (2013).
- 9) Ikeda, K. *et al.*: *Int. J. Mol. Med.*, **30**, 1307 (2012).