

Study on the immunochemical analytical system based on a monoclonal antibody against licorice components

藤井, 俊輔

<https://hdl.handle.net/2324/1932005>

出版情報：九州大学, 2017, 博士（創薬科学）, 論文博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）

(様式 9 - 3)

氏名	藤井 俊輔			
論文名	Study on the immunochemical analytical system based on a monoclonal antibody against licorice components			
論文調査委員	主査	九州大学	教授	森元聡
	副査	九州大学	准教授	宮本智文
	副査	九州大学	准教授	田中宏幸
	副査	第一薬科大学	准教授	森永紀

論文審査の結果の要旨

トリテルペノイド成分の一つであるグリチルリチン (GL) は甘草の主薬効成分であり、第 17 改正日本薬局方 (薬局方) では甘草の品質評価マーカーとして規定されている。また、GL は生体内で腸内細菌によってグルクロン酸部分が加水分解されグリチルレチン酸 (GA) へと代謝され吸収されることから、薬理活性の本体は GA であり、甘草が有する様々な薬理活性を探るうえで重要な成分であると目されている。また、甘草の主要フラボノイドであるリクイリチン (Liq) は、甘草の多彩な機能性を担う成分の一つであり、プロドラッグとしての研究や、漢方処方中の他成分との相互作用に関する研究などが行われている。しかしながら、甘草の大部分は中国を主体とする海外からの自生種の輸入に依存しており、乱獲による資源の払底も危惧されている。以上のことから、甘草の品質管理や育種研究において高品質な甘草の選抜は必要不可欠であり、簡便かつ、多検体の同時分析が可能な分析手法の開発が切望されている。

本研究では、甘草の品質管理・評価および育種研究を目的としてモノクローナル抗体 (mAb) を研究基盤とした免疫化学的分析手法の開発を行った。すなわち、著者の研究グループがこれまでに作製した抗 GL mAb に加えて、Liq に対する mAb の作製を遂行し、これらの mAb を用いた簡便かつ、特異的な免疫化学的分析手法の開発を行った。また、GA の生体内における挙動解析を行うための研究基盤を構築すべく、抗 GA mAb の作製と enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による分析法の開発を行った。さらに、ウラルカンゾウの選抜育種を行い、高 GL 含有株の作出を行った。

甘草の品質評価および GA の生体内挙動解析のための研究基盤を構築するために、Liq および GA に対する mAb の作製に着手した。Liq および GA-keyhole limpet hemocyanin コンジュゲートを免疫原として用いて、マウスに対して免疫感作を行った。免疫されたマウスの脾臓細胞とマウス骨髄腫細胞を細胞融合し、Liq および GA に対する mAb を産生するハイブリドーマ細胞 (2F8 および G-2A6) を樹立した。得られた mAb を用いて indirect competitive ELISA (icELISA) の開発を行った。抗 Liq および抗 GA mAb を用いた icELISA における各種バリデーション試験の結果、再現性、精度、回収率ともに良好な結果を得た。また、icELISA と HPLC を用いた定量分析値は良く相関していた。以上のことから、抗 Liq および抗 GA mAb を用いた icELISA は簡

便性、迅速性に優れた分析手法であり、甘草の品質評価および成分分析を目的としたイムノアッセイとして十分に適していると結論した。

次に、野生種の甘草において GL と Liq 含量の間には正の相関性が報告されていることから、GL と Liq の総含量を分析対象とする combination ELISA の開発を行った。icELISA をモチーフとして、抗 GL、抗 Liq mAb の混合抗体を一次抗体として利用することで、GL と Liq の総含量の分析が可能な分析手法を確立した。本法は、多成分系薬物である生薬のファーストスクリーニング法として、甘草の品質管理・評価に寄与できることが示唆された。

さらに、GL と Liq の特異的な検出かつ、両成分の可視化が可能なダブルイースタンブロットティングの開発を行った。Thin layer chromatography を用いて成分を展開後、ポリエーテルスルホン膜 (PES 膜) へ全成分を転写した。PES 膜を過ヨウ素酸ナトリウムで処理することで、GL および Liq の糖鎖を開裂した。次に、ウシ血清アルブミン (BSA) を加えシッフベースを PES 膜上で形成させ、BSA を介して両成分を膜上へ吸着させた。2 種の mAb (抗 GL、抗 Liq mAb) および基質 (3-amino-9-ethylcarbazole、4-chloro-1-naphthol) を反応させ、同一膜上で GL と Liq の検出を可能としたダブルイースタンブロットティングの開発に成功した。さらに、甘草切片の成分を直接 PES 膜へ転写し、GL と Liq の局在分布をダブルイースタンブロットティングを用いて調べたところ、甘草切片の髄質と師部に強い染色を認め、GL と Liq は甘草の根の同じ部位に局在していることを視覚的に明らかにした。

高 GL 含有株の作出を目的として、野生種 (147 株) および、栽培種 (90 株) の GL 含量を ELISA を用いて解析した結果、薬局方の基準を満たす株がそれぞれ 22.4% と 8.8% 見出された。また、モンゴルで採取した甘草の種子を 2 年間栽培し、個体毎に識別した 1025 株の GL 含量を調べた結果、4.92% の株において薬局方の基準を満たしていた。さらに、1025 株の甘草から 7 株 (GL 含量 > 4.0%) を選抜し、その同質性を確認することを目的として 2 年間継続栽培したのち、GL 含量をモニターした。5 株はその品質を維持したが、他の 2 株においては GL 含量が増加した株と、減少した株が見出された。以上の結果より、甘草の品質の指標となる GL 含量の差異は、生育年数に依存することを明らかとし、その品質は主として遺伝的に支配されることが示唆された。

本研究では、薬用植物の優良品種の作出に必要な分析法の開発を目的として、GA や Liq に対するモノクローナル抗体 (抗 GA mAb や抗 Liq mAb) を作製し、高感度で迅速な測定方法の開発に成功した。さらに甘草中の GL や Liq を直接可視化するシステムを確立した。これらの手法を用いて、資源の枯渇が懸念されているカンゾウの優良品種の作出に、大きく貢献するものと期待される。以上のことから申請者は博士 (創薬科学) の学位を取得するにふさわしいと判断した。