

DEVELOPMENT OF BIOASSAYS FOR THE DETECTION OF BENZYLISOQUINOLINE ALKALOIDS, HIGENAMINE AND BERBERINE

ポームラフィ, ヌンタウォン

<https://hdl.handle.net/2324/6787541>

出版情報 : Kyushu University, 2022, 博士 (臨床薬学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

氏 名	ポームラフィ ヌンタウオン		
論 文 名	DEVELOPMENT OF BIOASSAYS FOR THE DETECTION OF BENZYLISOQUINOLINE ALKALOIDS, HIGENAMINE AND BERBERINE		
論文調査委員	主 査	九州大学	教授 森元 聡
	副 査	山口東京理科大学	教授 田中 宏幸
	副 査	九州大学	准教授 麻生 真理子
	副 査	九州大学	准教授 坂元 政一

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

ベンジルイソキノリンアルカロイドは高等植物が生産する二次代謝産物で、それらの多くが興味深い生理活性を示すことから、医薬品として使用されているものが少なくない。例えば、ケシが生産する **papaverine** は耽溺性のない鎮痙薬として使用されており、またベンジルイソキノリン骨格から誘導される **morphine** は、強力な鎮痛活性を有することから、末期がん患者の疼痛治療に欠かせない重要な医薬品である。これらのベンジルイソキノリンアルカロイドに関しては多くの研究者によって優れた分析方法が開発されてきた。

一方、**higenamine (HM)** も高等植物が生産するベンジルイソキノリンアルカロイドの一種で、強心作用を有する化合物としてトリカブトより単離された。本化合物は β 2受容体のアゴニストとして機能し、興奮作用を有することが明らかにされていることから、**World Anti-Doping Agency (WADA)**は、各種スポーツの競技会における **HM** の使用を禁止している。しかしながら、**HM** は、トリカブトのみならず様々な植物が生産していることが明らかにされている。また丁子、呉茱萸、南天実、細辛などの汎用生薬や植物性サプリメントにもその存在が報告されており、これらの摂取によるドーピング違反が懸念されている。さらに、これまでに存在が報告されてなかった植物や生薬にも **HM** が含まれている可能性も考えられることから、正確に **HM** を分析する方法が望まれている。現在、**HM** の定量は主に高速液体クロマトグラフィーを用いた方法が用いられているが、本法は多大な時間と労力を要する。本論文では簡便で、高感度かつ迅速に **HM** を分析する方法を検討した。

Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (icELISA)の開発

HM の新規な定量法を開発するために、抗体を用いた **ELISA** の検討を行った。**HM** とウシ血清アルブミン (**BSA**) を結合させた **HM-BSA conjugates** をマウスに免疫した結果、血清中に **HM** に対する抗体価の上昇を確認した。このマウスから採取した脾臓細胞とミエローマを融合することによりハイブリドーマを調製し、**HM** に高い活性を示す抗体を産生するハイブリドーマを選抜した。本ハイブリドーマが生産するモノクローナル抗体 (**MAb E8**) を用いて **icELISA** を検討した結果、**HM** を感度良く検出する条件を決定した。本法では **HM** を 7.81–125 ng/mL の範囲で検出・定量することが可能であり、高速液体クロマトグラフィーで得られた定量値とよく一致することから、高い正確性も確認された。本成果は学術的には重要であり、国際誌である *Planta Medica* に掲載されている。また、本論文で開発した方法により植物、生薬、サプリメント等に含まれている **HM** を迅速・正確に検出・定量することが可能であり、**HM** 含有植物・食品の探索に極めて有効な手段となりえるもと考えられる。

Lateral flow immunoassay (LFA)の開発

本論文で開発した icELISA は、HPLC による定量法に比べて、高感度で HM 検出定量することが可能である。本稿では、さらに簡単な操作で HM を検出する方法を確立するために、LFA の検討を行った。テストストリップとして control zone および test zone にはそれぞれ抗 rabbit anti-mouse IgG antibodies および HM- γ -globulin conjugates を結合させたニトロセルロース膜を使用した。また、指示薬としてコロイド金ナノ粒子で標識した MAbs E8 を用いた。本テストストリップを用いて、ナンテンおよびトリカブトを分析したところ、HM の存在が確認されると同時に、19.0–156 ng/mL の濃度で HM の定量が可能であることが判明した。従来、LFA は定性分析のみに用いられることがほとんどであることから、今回開発した LFA により、簡単な操作で HM を定性・定量できたことは、本法が HM の探索に汎用されるものと期待される。本成果は、国際誌である *Drug Test Anal.* に掲載されている。

アプタマーを用いたベルベリンの高感度定量法の開発

ベルベリン(BBR)は、核酸と結合し蛍光を増強する性質がある。本研究では、金コロイド粒子を用いた SELEX 法 (GOLD-SELEX 法) を用いてベルベリン(BBR)に対する蛍光増強活性を有するアプタマーの選別及びその最適化を検討し、漢方処方薬に含まれる BBR の定量系へ応用した。まず、GOLD-SELEX 法による 7 ラウンド目のスクリーニングで BBR の蛍光増強活性を有するアプタマー (BBR38) を得ることに成功した。その後、BBR38 の最適化(短縮化、変異、多量体化)を行うことで、BBR38 と比較し、約 20 倍高い蛍光増強活性を有するアプタマー(TBBR38s)を得ることに成功した。これは、報告のある BBR に対する蛍光増強活性を有するアプタマーの約 10 倍も高い。続いて、この TBBR38s を用いて、5 分で検出可能な新規蛍光アッセイを確立し、夾雑物の多い漢方処方薬に含まれるベルベリンの正確な定量を達成した。アプタマーを漢方処方薬中の化合物の定量へ応用した報告は皆無である。

以上、本論文ではベンジルイソキノリンアルカロイドの迅速かつ高感度の定量法の開発に成功したことから、HM 含有植物・生薬・サプリメントなどの探索に大きく貢献できると思われる。また、アプタマーを用いたベルベリン定量法の開発では、動物を用いる必要がないことから、動物倫理的問題を解決する方法として、その汎用が期待される。

以上の結果より、本論文は博士 (臨床薬学) の学位を授与するに相応しいと判定した。