

モノクローナル抗体を用いた漢方製剤の指標成分に対する免疫学的分析法の開発

越智, 昭裕

<https://hdl.handle.net/2324/7182415>

出版情報 : Kyushu University, 2023, 博士 (創薬科学), 課程博士
バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)



氏 名 : 越智 昭裕

論文題名 : モノクローナル抗体を用いた漢方製剤の指標成分に対する免疫学的分析法の開発

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

背景

漢方医学とは 4-5 世紀ごろから伝えられてきた中国の医学が日本で独自の発展を遂げたものである。現在の日本でも漢方医学は広く普及しており、その中でも漢方薬に関しては 9 割以上の医師が日常的に処方している。漢方薬は天然由来且つ複数の生薬から構成されていることから、①数百から数千の多成分で構成されている、②植物の遺伝的要因や栽培方法、採取方法及び加工方法により原料生薬の品質が変化するという特徴を持っており、その標準化は困難である。日本薬局方(日局)では漢方薬を基にしたエキス剤である漢方製剤エキスが 39 品目収載されており、その薬理作用の均質化及び規格化を各漢方製剤エキスに複数設定された指標成分の含量を一定の範囲に収めることにより行っている。現在、日局では高速液体クロマトグラフィー及び定量核磁気共鳴スペクトル法によって漢方製剤エキス中の指標成分の定量を行っているが、これらの手法は高い正確性を有する一方で、①サンプルに対して複雑な前処理が必要である、②測定機器が高価である、③他検体同時分析に不向きであり、漢方製剤エキスの規格化に多大な時間と手間を要するといった問題点が存在する。そのため、より簡便な漢方製剤エキス中の指標成分に対する標準化法が必要とされている。本論文では、各生薬指標成分に対して特異的なモノクローナル抗体(mAb)を用いたイムノアッセイに着目し、従来の手法よりも簡便な漢方製剤エキスの標準化法及び検出法の開発を行った。

第一章 抗 Saikosaponin b2 mAb の作製及びアッセイ系の構築

柴胡はミシマサイコ(*Bupleurum falcatum* Linné)の根を乾燥させた生薬であり、主に抗炎症作用を目的として様々な漢方薬に配合されている。柴胡の主要な活性物質はオレアナン型トリテルペンの一種であるサイコサポニン類(SS 類)とされている。本章では、SS 類のうち、柴胡を構成生薬とする漢方製剤エキスの指標成分であるサイコサポニン b2(SSb2)に対する mAb の作製及びこれを応用した間接競合酵素標識免疫吸着測定法(icELISA)の構築を行

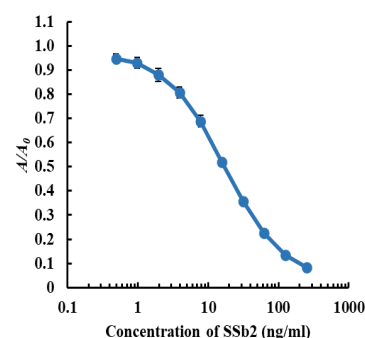


Fig. 12 mAb 6G8 の検量線

った。柴胡には SSb2 はほとんど含まれていないものの、漢方薬の調製中に生成することが知られており、SSb2 に対する定量法の確立は漢方製剤エキスの標準化のみならず、漢方薬中の成分

変化に関する評価にも利用できる可能性がある。第二節では、 NaIO_4 を用いて SSb2 の BSA コンジュゲートを調製し、マウスに免疫感作を行った。その後、PEG 法により細胞融合を行い、抗 SSb2 mAb を産生するハイブリドーマ株 6G8 を得た。第三節では、mAb 6G8 の特徴付けを行い、mAb 6G8 を用いた icELISA の検量域は $1.95\text{--}125\text{ ng/ml}$ と従来法の約 250 倍の感度を有することが明らかとなった(Fig. 1)。また、交差反応性試験の結果から、mAb 6G8 は他の SS 類に対してほとんど反応性を持たず、SSb2 に対し高い特異性を有することが示された。さらに、icELISA 及び LC-MS を用いて柴胡を含む漢方製剤中の SSb2 量の定量を行ったところ、高い相関が見られた。また、添加回収においても良好な値を示した。このことから、本 ELISA が漢方製剤の品質評価法として利用可能であることが示唆された。

第二章 大黃甘草湯中の指標成分の検出を目的とした LFA の構築

現在日局では、漢方製剤エキスの標準化を指標成分の含量を定量することで行っている。その一方で、病院等で調剤される漢方薬はその原料生薬こそ標準化されているものの、これによって作られた漢方薬が日局の規格を満たしているとは言い切れない。そこで本章では、代表的な漢方薬の一つである大黃甘草湯に対し短時間且つ簡便に行うことのできる品質評価法として、大黃甘草湯の指標成分である SA 及び GC に対するラテラルフローイムノアッセイ(LFA)の開発を行った(Fig. 2)。LFA は他の免疫学的測定法と比較し迅速な測定が可能であり、さらに、一切の測定機器を必要としないという

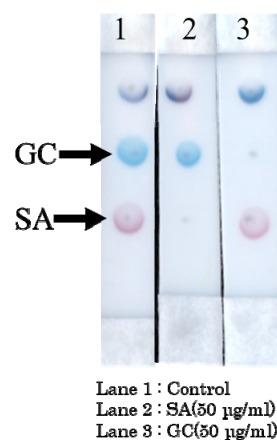


Fig. 2 SA 及び GC に対する

利点が存在するため、調剤された漢方薬の品質評価に非常に適している。第二節では、抗 SA mAb 及び抗 GC mAb に対してレポーターナノ粒子の標識を行った。第三節ではまず、LFA に用いるテストストリップの作製を行った。続いて、LFA における SA 及び GC に対する検出限界の確認を行ったところ、その検出限界はいずれも $3.13\text{ }\mu\text{g/ml}$ であった。さらに、LFA によって大黃甘草湯エキス抽出物中の SA 及び GC の検出を行ったところ、本 LFA が各化合物の検出及び濃度の推定が可能であることが示唆された。本章で確立された LFA は、これまであまり行われてこなかった調剤された漢方薬の品質保証に貢献できると考えられる。

総括

本研究では、漢方製剤エキスに対する定量法及び病院等で調剤された漢方薬に対する品質評価法の確立を行った。これらの手法は従来法と比較し短時間且つ簡便な操作で品質評価を実施することが可能である。近年では ICD-11 に伝統医学の項目が追加され、漢方薬に対する世界的な注目が高まっているため、漢方薬への品質評価に対する需要も増大していくことが予想される。そのため、本研究で確立した系はより幅広い場で漢方薬の安全性・有効性の確保に貢献できると考えられる。