

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)



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

生薬学分野 3PS21013N 越智 昭裕

【序論】

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^[1]。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^[2]。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(HPLC)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。まず、より簡便な柴胡を構成生薬とする漢方エキスに対する標準化法の確立を目的として、その指標成分であるサイコサポニンb2(SSb2)に対するモノクローナル抗体(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)の構築を行った。その後、柴胡含有漢方エキス製剤中のSSb2含量の測定を行った。続いて、病院等で調剤された漢方薬に対する迅速な品質評価を目的として、便秘症に頻用される漢方薬である大黄甘草湯の指標成分であるグリチルリチン酸(GC)及びセンノシドA(SA)に対するラテラルフローイムノアッセイ(LFA)の開発を行い、その後、大黄甘草湯中のGC及びSAの同時検出を行った。

【実験】

過ヨウ素酸ナトリウム(NaIO_4)を用いてSSb2-BSAの調製を行い、これをBALB/cマウスに免疫感作した。6次免疫後、マウス脾細胞の調製を行い、PEG法によって細胞融合した。得られたハイブリドーマ細胞に対してスクリーニングを行うことで、抗SSb2 mAb産生ハイブリドーマ株6G8を樹立した。ハイブリドーマ株6G8を培養し、培養上清をプロテインGアフィニティーカラムで精製することによりmAb 6G8を得た。mAb 6G8のアイソタイプの決定、検量域の検討及び交叉反応性の確認を行った。その後、柴胡を構成生薬とする漢

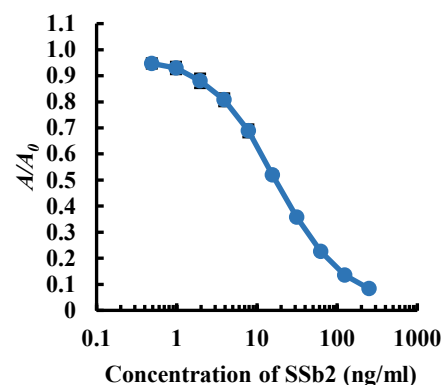


Fig. 1 mAb 6G8 の検量線

方製剤中に含まれる SSb2 の定量を icELISA 及び LC-MS により行うことで、本 icELISA が SSb2 の定量に利用可能であることを確認した。さらに、本 ELISA に対して Intra-アッセイ及び Inter-アッセイと添加回収試験を行うことで、正確性及び信頼性の評価を行った。

続いて、以前当研究室にて作製された抗 GC mAb 及び抗 SA mAb に対してレポーターナノ粒子であるプルシアンブルーナノ粒子 (PBNPs) 及び金ナノ粒子 (GNPs) の標識を行った。これらのレポーターナノ粒子の標識法には、受動吸着法を用いた。次に、テストストリップのテストゾーンに固定化するための GC-BSA 及び SA-HSA の調製をそれぞれ NaIO₄ 及び EDC を用いた調製法により行った。その後、本 LFA で用いるテストストリップの作製を行った。作製したテストストリップの GC 及び SA に対する反応性の確認のため、PBNPs 標識抗 GC mAb 及び GNPs 標識抗 SA mAb の混合溶液と 0.195–25.0 µg/ml の GC 及び SA を用いて LFA を行った。この時、コントロールゾーンに紫色のスポットが観察され、テストゾーンに PBNPs 及び GNPs 由来のスポットが全く存在しない状態を陽性、わずかにでもスポットが認められる状態を陰性と定義した。また、甘草及び大黄に含まれる成分を中心に計 18 化合物を選定し、本 LFA の交差反応性の精査を行った。さらに、甘草、大黄、大黄甘草湯エキス製剤及び大黄甘草湯エキスに対してメタノール抽出を行い、得られた抽出液の 20 倍希釈溶液を検出サンプルとして LFA を行った。LFA により得られた結果を icELISA による検出サンプルの定量結果と比較することで、本 LFA の妥当性の確認を行った。

Table 1 SS 類に対する交差反応性

化合物	CRs (%)
SSb2	100
SSb1	4.50
SSa	0.0230
SSd	<0.009
SSc	0.0982

【結果】

Table 2 柴胡含有漢方エキス製剤の定量

Samples	SSb2 (µg/mg)	
	icELISA	LC-MS
乙字湯	1.71 ± 0.0515	1.56 ± 0.0121
大柴胡湯	2.35 ± 0.170	2.43 ± 0.136
柴胡桂枝湯	1.58 ± 0.108	1.58 ± 0.0251
補中益気湯	0.706 ± 0.0279	0.685 ± 0.0303
柴朴湯	2.21 ± 0.0482	2.27 ± 0.0128
柴苓湯	1.51 ± 0.0504	1.82 ± 0.0364

mAb 6G8 のアイソタイプの確認を行ったところ、軽鎖が κ 鎖の IgG 抗体であることが明らかとなった。続いて、mAb 6G8 を用いて icELISA を行ったところ、検量域は 1.95–125 ng/ml であった (Fig. 1)。また、交差反応試験の結果から、mAb 6G8 は他のサイコサポニン (SS) 類に対してほとんど反応性を持たず、SSb2 に対する高い特異性を持つことが示された (Table 1)。さらに、icELISA を用いて柴胡を構成生薬とする漢方製剤中に含まれる SSb2 の定量を行ったところ、LC-MS の結果と高い相関が見られた (Table 2)。Intra-、Inter-アッセイ及び添加回収試験を行ったところ、いずれも良好な値を示し、本 icELISA が高い正確性と信頼性を有することが示唆された。

また、作製したテストストリップを用いた LFA の GC 及び SA に対する検出限界の確認を行ったところ、その検出限界は共に 3.13 µg/ml であった (Fig. 2)。続いて、LFA の交差反応性の確認を行ったところ、GC、SA 及びセンノシド B (SB) に対して反応性が認められた (Fig. 3)。LFA により抽出液中の GC 及び SA の検出を行い、icELISA の定量値との比較を行ったところ、両方でその結果は一致していた (Fig. 4)。

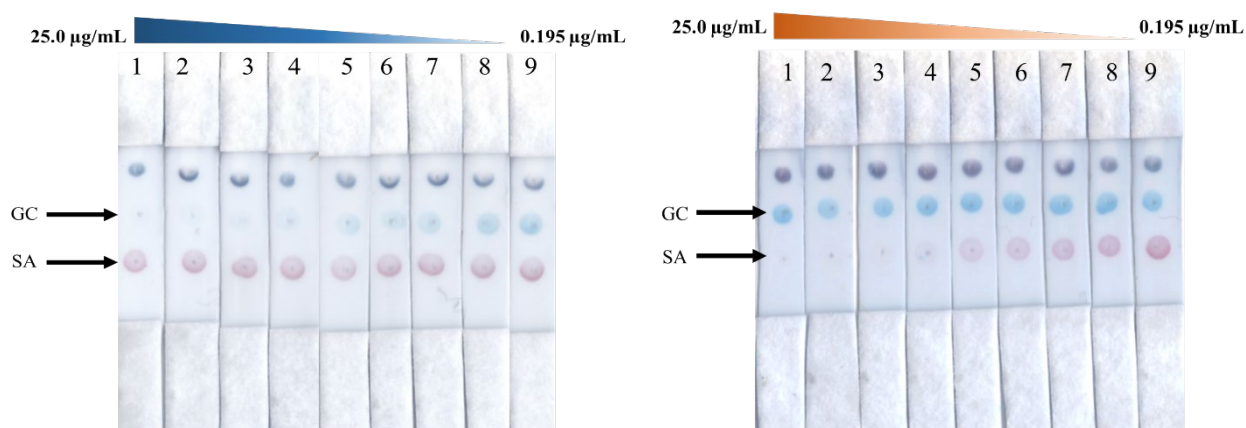


Fig. 2 LFA による GC (左) 及び SA (右) の検出

Lane 1–8 は種々の濃度の GC 及び SA を、Lane 9 は 0.005%(v/v)NH₃(28%)含有 5%メタノールをサンプル溶液として用いた。

【考察】

icELISA の検量域は 1.95–125 ng/ml であり、現行の品質評価法と比較してその感度は約 250 倍であることが明らかとなった (Fig. 1)。また、icELISA を用いて柴胡を構成生薬とする漢方薬の抽出物中に含まれる SSb2 の定量を行ったところ、LC-MS の結果と高い相関が見られ、mAb 6G8 を用いた icELISA が SSb2 の定量に利用可能であることが示唆された (Table 2)。一方で、柴胡を含有する漢方薬中の SSb2 の定量において、その SSb2 含量は日局で定められた基準値を大きく超えていた。原因としては、本章で行った抽出過程の操作が日局で規定された方法と異なることが挙げられる。本項で用いた漢方エキス製剤の抽出サンプルは、50%メタノールを添加後、ソニケーションを行うことにより調製したのに対し、日局では、50%メタノールを添加後、振り混ぜることによって抽出する。加えて、分液等の操作が加わるため、SSb2 の抽出効率が低下することが考えられる。このことは、本 ELISA が SSb2 に特異的な mAb 6G8 を利用しているため、抽出効率の低下に繋がる分液等の操作を行う必要がなく、基準値などを再設定することで本 ELISA はより現実的に即した標準化を行うことができる可能性があることを示唆している。icELISA は HPLC 等の測定法と比較して安価で簡便な手法であり、また、短時間での複数サンプルの同時分析が可能であることから、本 ELISA は漢方エキス中の SSb2 の定量法として優れた手法であると考えられる。

LFA の交差反応性の確認において、検出対象外である SB に対して反応性が見られたものの、その色度は SA の 3.13 µg/ml のものと近似しており、抗 SA mAb の交差反応性 (約 10%) と概ね一致していた (Fig. 3)。交差反応性の確認の結果から、本 LFA で用いたレポーターナノ粒子標識 mAb が

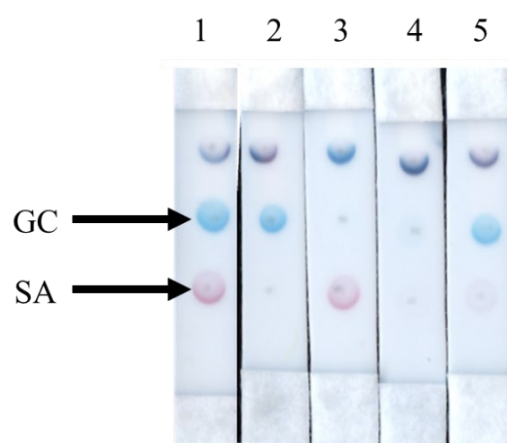


Fig. 3 LFA の交差反応性の確認

Lane 1: Control, Lane2: SA (50 µg/ml), Lane 3: SA (50 µg/ml), Lane 4: GC+SA (50 µg/ml), Lane 5: SB (50 µg/ml) をサンプル溶液として用いた。

オリジナルの抗 GC mAb 及び抗 SA mAb と同等の特異性を持つことが示された。LFA による検出において陰性を示した各大黄甘草湯エキス製剤 (ツムラ及び大杉製薬) のテストゾーンの色調を GC 及び SA の標品を用いて行った LFA の色調と比較し、各エキス製剤抽出物に含まれる GC 及び SA 濃度の推定を行ったところ、ツムラの大黄甘草湯エキス製剤抽出物中の GC 及び SA 濃度はそれぞれ約 3.13 µg/ml 及び 3.13 µg/ml、大杉製薬の大黄甘草湯エキス製剤抽出物中の GC 及び SA 濃度はそれぞれ約 1.56 µg/ml 及び 1.56 µg/ml であり、icELISA の結果と近い値を示していた (Fig. 4)。このことは、本 LFA が大黄甘草湯中の指標成分の検出だけでなく、半定量性を有することを示唆している。

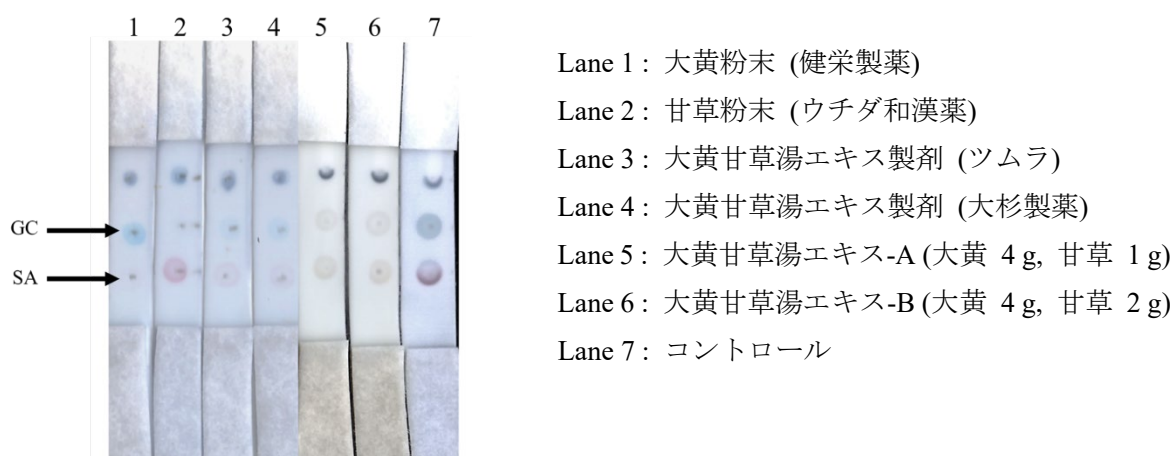


Fig. 4 LFA による植物抽出サンプル中の GC 及び SA の検出

各 Lane のサンプルには、各抽出物の 20 倍希釈溶液を用いた。また、Lane 7 に関してはコントロールとして 0.005%(v/v)NH₃(28%)含有 5%メタノールをサンプル溶液として用いた。

LFA は感度及び正確性の面では他の検出法に及ばないものの、一切の測定機器を必要とせず、検出に必要な時間も 30 分以内と非常に短い。現在、漢方製剤に対する標準化は行われているものの、調剤された漢方薬に対しては行われておらず、これが標準化された漢方製剤と同等の有効性を持っているとは言いきれない。そのため、本 LFA は調剤された大黄甘草湯の品質評価に用いることで、その品質を保証することが期待される。

本研究で確立した漢方製剤エキスに対する定量法及び病院等で調剤される漢方薬に対する品質評価法はいずれも従来法と比較して短時間且つ簡便な操作によって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。漢方薬に対する品質評価への需要も高まることが予想されるため、本研究で確立した系は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。

【引用文献及び発表論文】

- [1] Wakasugi A., *Organ Biology*, **23** (2016), 46–52
- [2] Hakamatsuka T., *Yakugaku zasshi*, **140** (2020), 783–788
- [3] Ochi A., Fujii S., Ohta T., Uto T., Nuntawang P., Tanaka H., Morimoto S., Sakamoto S., *Journal of Natural Medicines*, **78** (1), 2024, 160–168
- [4] Ochi A., Nuntawang P., Chaingam J., Ota T., Juengwatanatrakul T., Putalun W., Shoyama Y., Tanaka H., Morimoto S., Sakamoto S., *Phytochemical Analysis*, in press, 2024