

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）



Study on the Immunochemical Analytical System Based on a Monoclonal Antibody against Licorice Components

(甘草含有化合物に対するモノクローナル抗体を研究基盤とした
免疫化学的分析手法に関する研究)

藤井 俊輔

【序論】

カンゾウ（甘草）はマメ科の多年生草本で、根およびストロンを薬用部位とする。甘草は日本で使用される医療用漢方エキス製剤の約 70% に配合される最汎用生薬の一つであると同時に、肝炎やアレルギーに対する治療薬の医薬資源としても重要である。さらに、甘草は立ち上がりが遅い特徴的な甘味を呈するため、味噌や醤油、菓子類、清涼飲料水へ甘味料として使用されるなど、その用途は多岐に渡っている。これまでに、甘草から 500 種を超える化合物が単離・精製されている。甘草が含有する種々のトリテルペノイドの中でもグリチルリチン（GL）は、甘草の主薬用成分として知られていると共に、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。さらに、GL は摂取後、生体内で腸内細菌により GL のグルクロン酸部分が加水分解されグリチルレチン酸（GA）へと代謝されたのちに吸収されるため、GA が甘草の様々な薬理活性に重要な関わりをもつ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の一つ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。また、生育環境や種が異なると甘草の成分プロファイルに大きな差が生じることが報告されていることから、その品質管理・評価、育種研究は極めて重要であり、なおかつ実用性の高い研究であるといえる。以上のことから、高品質な甘草の選抜は必要不可欠なステップであり、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、著者の研究グループがこれまでに作製を行った GL に対するモノクローナル抗体（mAb）に加えて、抗 Liq mAb の作製を行い、甘草の品質管理を目的としてこれらの mAb を用いた enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）や、ダブルイースタンブロットティングの開発を行った。また、GA の生体内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 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。

【方法】

1. 抗 Liq mAb の作製および ELISA の確立

免疫原として、Liq の糖部を過ヨウ素酸ナトリウムを用いて酸化開裂し、アルカリ条件下で keyhole limpet hemocyanin（KLH）のリジン残基とシッフベースを形成しコンジュゲートを調製した。Liq-KLH コンジュゲートを免疫原としてマウスに免疫感作を行い、Liq に対する抗体誘導を確認後、ポリエチレングリコール（PEG）を用いて、マウス骨髄腫細胞とマウス脾臓細胞を細胞融合し、抗 Liq mAb を産生するハイブリドーマ細胞（2F8）を樹立した。免疫原と同様に調製した Liq-ヒト血清アルブミン（HSA）を固相化抗原として、抗 Liq mAb を用いた indirect competitive ELISA（icELISA）を確立した。

2. 抗 GA mAb の作製および ELISA の確立

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide をクロスリンカーとして、GA- KLH コンジュゲートを調製し、免疫原として用いた。常法に従い PEG を用いた細胞融合を実施し、抗 GA mAb を産生するハイブリドーマ細胞 (G-2A6) を樹立した。ヒト血清中の GA の検出においては、試料にメタノールを添加し攪拌後、遠心分離して除タンパクを行ったものを分析試料として、抗 GA mAb を用いた icELISA によって分析を行った。

3. Combination ELISA の開発

GL および Liq-HSA を共に固相化し、抗 GL、抗 Liq mAb の混合抗体 (抗 GL/Liq mixture mAbs) を一次抗体として競合反応させた。次に酵素標識二次抗体、基質を添加し検出を行い、甘草および漢方製剤粗エキス中の GL と Liq の総含量の定量分析を行った。

4. ダブルイースタンブロッティングの開発

甘草および漢方製剤粗エキスを TLC で展開し、polyethersulphone (PES) 膜へ全成分を転写した。次に PES 膜を過ヨウ素酸ナトリウムで処理後、ウシ血清アルブミン (BSA) と反応させ PES 膜上で GL および Liq-BSA コンジュゲートを形成し、BSA を介して GL および Liq を膜上へ固定化した。ブロッキング後、2 種の mAb (抗 GL、Liq mAb) および基質 (3-amino-9-ethylcarbazole、4-chloro-1-naphthol) を用いて、ダブルイースタンブロッティングによる GL および Liq の定性分析法を開発した。

5. ウラルカンゾウの選抜育種

イースタンブロッティングを用いて、モンゴル産 (147 株) および佐賀県玄海町において栽培したウラルカンゾウ (90 株) の GL を解析した。さらに詳細な GL 含量を調べるために、ELISA を用いて GL 含量の解析を行った。また、種子から 2 年間栽培し、個体毎に戸籍を付けた 1025 株の甘草から 7 株 (GL 含量 > 4.0%) を ELISA を用いて選抜し、その同質性を確認するために 2 年間継続栽培後、GL 含量をモニターした。

【結果および考察】

1. 抗 Liq mAb の特徴付けと icELISA の開発

抗 Liq mAb を用いた icELISA における検量域は 0.39–25 µg/mL であった。また、抗 Liq mAb の交差反応性を精査したところ、Liq のアグリコンであるリクイリチゲニンおよび、Liq と同様のフラバノン骨格を有するヘスペレチン、ナリングニンに対してそれぞれ 42.5、66.8、16.7% の交差反応性を示した。一方で、フラバノン配糖体や、その他のフラボノイド類に対して交差反応性を示さなかったことから、本抗体は C-7 位の水酸基と C-2 位の立体構造が重要な抗原認識部位であることが示唆された。さらに各種バリデーション試験の結果、ウェル間および、プレート間での変動係数は 0.60–5.46%、Liq の添加回収率は 100.9–103.7% であり、精度、再現性共に優れた分析手法であることが確認された。また、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた Liq の定量値と比較した結果、良好な相関性を示したことから、本抗体を用いた icELISA は簡便性、迅速性にも優れた分析手法であり、Liq を品質の指標とした品質評価法として十分に適用出来ると結論した。

2. 抗 GA mAb の特徴付けと icELISA の開発

抗 GA mAb を用いた icELISA における検量域は 3.91–125 ng/mL であった。次に、抗 GA mAb の交差反応性を調べた結果、GA の配糖体である GL や 3-モノグルクロニル GA や、その他の構造類縁化合物に対して交差反応性を示さなかったことから、GA の骨格および、糖鎖の有無が抗体の認識に重要であることが推察された。また、ウェル間、プレート間の変動係数の平均はそれぞれ 1.60、3.01% であった。さらに、添加回収率を精査した結果、icELISA における GA の回収率は、平均 101.76% であった。また、HPLC を用いた GA 分析とよく一致する結果が得られた。したがって、本抗体を用いた icELISA は GA の特異的なイムノアッセイであると結論した。

次に、ヒト正常血清に GA を添加したサンプルにおける GA の回収率を調べたところ、夾雑物の影響を受けることなく良好な回収率 (100.8–104.4%) が得られた。以上の結果から、抗 GA mAb を用いた icELISA を研究基盤とすることで、血清などの生体試料においても簡便な分析が可能であり、甘草の成分分析のみならず、甘草摂取後の生体内挙動解析に貢献できるものと考えている。

3. Combination ELISA の開発

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、抗 GL、抗 Liq mAb の混合抗体 (抗 GL/Liq mixture mAbs) を用いて、GL と Liq の総含量を分析対象とする combination ELISA を開発した。GL と Liq (GL: Liq = 1: 1) の混合標準液を用いて検量線を作成した結果、0.05–12.50 µg/mL の濃度範囲において良好な直線性が確認された。次に、各種バリデーション試験を行った結果、分析の精度、再現性ともに良好な結果を得た。また、GL と Liq の混合比率を種々に変化させた際の GL と Liq の総含量の回収率を精査したところ、GL: Liq = 10: 0–4: 6 の範囲において良好な回収率 (97.29–104.62%) が確認された。さらに、抗 GL/Liq mixture mAbs を用いた combination ELISA の分析値は、GL と Liq に対するそれぞれの mAb を用いた icELISA による GL と Liq の総含量の分析値とよく一致した。以上の結果より、抗 GL/Liq mixture mAbs を用いた combination ELISA は簡便性、迅速性および、感度の面で優れた分析手法であり、多成分系薬物である生薬や漢方薬のファーストスクリーニング法として、品質管理・評価に寄与できることが示唆された。

4. ダブルイースタンブロッティングの開発

まず、抗 Liq mAb を用いた Liq のイースタンブロッティングの開発を行った。TLC で成分を展開後、PES 膜へ全成分を転写し、前述の通り BSA を介して Liq を PES 膜上へ固定した。次に、抗 Liq mAb、酵素標識二次抗体、基質を順次反応させ、Liq の特異的な免疫染色手法を確立した。著者が所属する研究グループでは、GL のイースタンブロッティングによる検出法も確立している。そこで新たに、GL と Liq の二重染色法について条件検討を行った。その結果、2 種の mAb (抗 GL、抗 Liq mAb) および基質 (3-amino-9-ethylcarbazole、4-chloro-1-naphthol) を用いることで GL と Liq のみを特異的に検出可能なダブルイースタンブロッティングの開発に成功した。次に、GL と Liq の定量分析値とダブルイースタンブロッティングの発色強度やバンドの大きさには相関性が認められ、GL と Liq を視覚的に検出できる汎用性の高い分析手法であることを確認した。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ティングを用いて検出を行った。その結果、GL と Liq は甘草の根の同じ部位 (髄質および師部) に局在することを視覚的に明らかにした。

5. ウラルカンゾウの選抜育種および高 GL 含有株の作出

モンゴル産のウラルカンゾウ（野生種）と、佐賀県玄海町において栽培したウラルカンゾウ（栽培種）の GL をイースタンブロッティングを用いて解析した結果、バンドサイズが大きい株が数種見出された。ELISA を用いて GL 含量を精査したところ、バンドサイズと icELISA による GL の定量値はよく一致したことから、甘草の選抜育種研究におけるファーストスクリーニングに適用可能であることが示された。次に、野生種（147 株）および、栽培種（90 株）の GL 含量を ELISA を用いて調べたところ、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、1025 株の GL 含量を調べた結果、GL の含量は 0.15–5.36%と幅広く分布し、4.92%の株において薬局方の基準を満たしていた。次に栽培された甘草の同質性を確認するために、1025 株から選抜した 7 株の高品質甘草（GL 含量 >4.0%）の GL 含量を、2 年間の継続栽培ののち確認した。7 株のうち 5 株はその品質を維持したが、残りの 2 株においては GL 含量が増加した株と、減少した株となった。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、甘草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。現在、高 GL 含有株の作出を目的として、選抜した高品質甘草のストロンをクローン化し栽培を継続中である。

【発表論文】

1. Fujii, S., Morinaga, O., Uto, T., Nomura, S., Shoyama, Y. Development of a monoclonal antibody-based immunochemical assay for liquiritin and its application to the quality control of licorice products. *J. Agric. Food Chem.*, 16 (2014) 3377-3383.
2. Fujii, S., Tuvshintogtokh, I., Mandakh, B., Munkhjargal, B., Uto, T., Morinaga, O., Shoyama, Y. Screening of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. ex DC. containing high concentrations of glycyrrhizin by Eastern blotting and enzyme-linked immunosorbent assay using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody for selective breeding of licorice. *J. Nat. Med.*, 68 (2014) 717-722.
3. Fujii, S., Morinaga, O., Uto, T., Nomura, S., Shoyama, Y. Development of double eastern blotting for major licorice components, glycyrrhizin and liquiritin for chemical quality control of licorice using anti-glycyrrhizin and anti-liquiritin monoclonal antibodies. *J. Agric. Food Chem.*, 64 (2016) 1087-1093.
4. Fujii, S., Tung, N.H., Uto, T., Tanaka, H., Li, X.W., Cai, S.Q., Putalum, W., Shoyama, Y. Quality control of natural products by fingerprinting of eastern blotting. *Pharmaceutica Analytica Acta.*, (2016) doi: 10.4172/2153-2435.1000494.
5. Fujii, S., Morinaga, O., Uto, T., Nomura, S., Shoyama, Y. Simultaneous determination of glycyrrhizin and liquiritin in licorice roots and Kampo medicines by combination enzyme-linked immunosorbent assay using anti-glycyrrhizin and anti-liquiritin monoclonal antibodies. *J. Immunoassay Immunochem.*, 38 (2017) 285-298.
6. Fujii, S., Uto, T., Nomura, S., Shoyama, Y. Preparation of anti-glycyrrhetinic acid monoclonal antibody for application in an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal Lett.*, (2017) doi: 10.1080/00032719.2017.1370598.