

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：37107

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670373

研究課題名(和文) イースタンブロット法を利用した漢方薬アレルギー診断システムの開発

研究課題名(英文) Development of an allergy diagnostic system for kampo medicine using eastern blot technique

研究代表者

森永 紀 (Morinaga, Osamu)

第一薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60465771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：副作用報告のある漢方薬の主要な成分の中でも各種フラボノイドに着目し、カンゾウのリクイリチン、チンピのヘスペリジンに対する高感度なイースタンブロット法の開発を行った。フラボノイド配糖体は、腸内細菌で代謝され、肝臓で抱合反応を受ける生薬成分であり、抱合化代謝産物が原因で各種副作用が生じるのではないかと考えている。また、間質性肺炎の原因をサイコに含まれるフラボノイドのナルシシンと想定し、高感度に検出できるイースタンブロット法の開発に取り組んだ。漢方薬の副作用の軽減を目的にダイオウ製剤中のセンノシドA、Bを分析し、1錠または1包当たりの含有量から副作用の下痢を未然に防げないか検討した。

研究成果の概要(英文)：We focused on various flavonoids among major components of kampo medicine with adverse reaction reports and developed highly sensitive eastern blotting method for liquiritin and hesperidin. The flavonoid glycoside is metabolized by intestinal bacteria and undergoes a conjugation reaction in the liver, and it is thought that various adverse reaction reports may be caused by the conjugated metabolite. In addition, we assumed the cause of interstitial pneumonia as narcissin and then worked on the development of eastern blotting method which can detect with high sensitivity. Senosides A and B in kampo medicines were analyzed for the purpose of reducing the adverse reaction reports of kampo medicine, and examined as to whether it is possible to prevent adverse reaction reports of diarrhea from sennoside A and B contents per tablet or per package.

研究分野：生薬学

キーワード：漢方薬 副作用 アレルギー 間質性肺炎 下痢 イースタンブロット法 フラボノイド配糖体 センノシド

1. 研究開始当初の背景

漢方薬のように特に長期に服用され、緩慢な作用であることから見過ごされがちなアレルギー症状を簡便な方法で検査できることにより、投薬の有効性とリスク評価のバランスをとった服薬指導が実現できると考えられる。

申請者は漢方薬中の生薬成分を、イースタンプロット法を基盤とした dot blot 法と免疫化学発光法を用いて、超高感度且つ網羅的に定性・定量分析できる手法への開発に成功している。イースタンプロット法は九州大学薬学研究院の正山研究室(2001年)において、申請者らが世界に先駆けて開発し命名した低分子薬用成分の新しい検出法である。この方法は薄層クロマトグラフィー(TLC)で分離した薬用成分を PVDF 膜へ転写し、過ヨウ素酸ナトリウム処理後、BSA(牛血清アルブミン)溶液を添加し、目的低分子のモノクローナル抗体(MAb) 酵素標識二次抗体、基質を順次添加しターゲット生薬成分を免疫染色(抗体染色)する手法である。ビジュアル(視覚)的に検出できる説得力の大きな手法との評価が高い。本法は 2004 年申請者によって、ポリエーテルスルホン(PES)膜と画像解析ソフトの NIH Image を使用して、生薬成分を PES 膜で展開・分離し、直接膜上で抗原抗体反応を行い、免疫染色スポットを NIH Image で解析、数値化することで生薬成分を定量分析する新規方法に改良され、特許取得に至っている(配糖体の分析方法、特許第 4268561 号)。さらに、申請者は漢方薬中の生薬成分を、イースタンプロット法を基盤とした dot blot 法と免疫化学発光法を用いて、成分の展開・分離を必要としない生薬成分の超高感度な網羅的定性・定量分析法の開発に成功している。その結果、多数の漢方薬に含まれる特定の生薬成分の一斉分析が可能となった(図1)。これらの研究成果から複数の生薬成分(アレルギー)を PES 膜に固定化し、アレルギー症状を呈するマウスおよびヒト血清を用いて PES 膜上で抗原抗体反応を行うことで、*in vitro* での漢方薬アレルギー検査が可能ではないかと考えた。

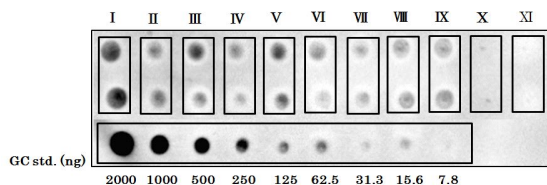


図1 Dot blot 法を用いた免疫化学発光法による各種漢方薬中のグリチルリチンの検出

I: 葛根湯, 安中散, 加味逍遙散, 麦門冬湯, 十全大補湯, 潤腸湯, 薏苡仁湯, 平胃散, 柴胡清肝湯, -XI; N.C.(BSA, 半夏厚朴湯)

また、申請者のこれまでの研究成果より生薬成分のような低分子化合物でも BSA のような高分子化合物と結合することで免疫原

となり、生薬成分に特異的な抗体がマウス生体内で産生されることが一般的な知見となっている。つまり、生体内において生薬成分が血清アルブミンと結合することで抗原(=アレルギー)となり、生薬アレルギーを引き起こす可能性を見出している。

一般に薬物アレルギーの診断法として、再投与による誘発試験やリンパ球刺激試験がある。誘発試験は原因薬物を特定する上で最も直接的な証明法であるが、重篤な症状を来す症例では試験の施行は大変危険であり、安易に行うことが出来ない。一方、リンパ球刺激試験は薬剤に感作されたリンパ球と薬物抗原とが反応し、リンパ球が幼若化するという現象を利用した遅延型アレルギー反応に対する薬物を特定する方法である。しかし、生薬成分の中にはリンパ球にマイトジェン活性を有する成分や、細胞増殖抑制作用の強い成分などが含まれることが多いため、生薬成分アレルギー診断法に適した方法とは言い難い。また、同じ生薬の有効成分でもさまざまなアレルギー構造が生成され、それに対する様々な抗体が生成していると考えられることから、イースタンプロット法を用いることで様々な生薬成分に対する抗体生成の変動の一端も見ることができ、多くの成分を含む漢方薬からアレルギーを同定し、アレルギー特異的抗体も検出する、抗原側と抗体側からの両アプローチによるユニークな漢方薬アレルギー診断・検査方法が期待される。

2. 研究の目的

本研究では副作用報告のある漢方薬の主要な成分の中でも各種フラボノイド化合物に着目し、カンゾウのリクイリチン、チン皮的ヘスペリジンに対する超高感度なイースタンプロット法の開発を第一の目標とした。

小柴胡湯による間質性肺炎は、薬剤アレルギーによる薬剤性間質性肺炎といわれている。小柴胡湯の中心となる生薬はサイコであり、主要な成分としてサイコサポニン類(トリテルペン配糖体に分類)を含んでいる。本研究ではサイコサポニン類に対する超高感度なイースタンプロット法の開発に加え、文献情報によりサイコに含まれるフラボノイド配糖体のナルシニンに着目し、モノクローナル抗体の作製を第二の目標とした。

また、ダイオウ配合漢方薬の服用により、便秘症以外の者の下痢や服用中の母親からの授乳による乳児の下痢が報告されている。そこで、その原因物質であるアントラキノン配糖体のセンノシド A、B についてダイオウ配合医薬品の分析を実施し、1錠または1包当たりのセンノシド A、B の含有量から下痢などの副作用を未然に防げないか検討した。

3. 研究の方法

(1) 各種フラボノイド配糖体に対するイースタンプロット法

TLC にてリクイリチン、ヘスペリジンを展開

開後、加熱・加圧により TLC から PES 膜にリクイリチン、ヘスペリジンを転写させた。加ヨウ素酸ナトリウム処理後、BSA 溶液を添加し、膜上でリクイリチン-BSA、ヘスペリジン-BSA を形成し、ブロッキング後、一次抗体、酵素標識二次抗体、基質を添加し、リクイリチン、ヘスペリジン検出法を確立した。

(2) 間質性肺炎の副作用報告のある漢方薬に配合される生薬成分に対する MAb の作製
文献情報によりサイコに含まれるフラボノイド配糖体のナルシシンに着目し、ナルシシンに対する MAb の作製を実施した。ナルシシン キャリア 蛋白(BSA, HSA, KLH 等) 複合体を調製し、マウス腹腔内に 1, 2 回目はフロイントのアジュバントと一緒に、3 回目以降は免疫原のみを腹腔内投与した。2 回目以降、マウス尾静脈より採血を行い、ナルシシンに対する血中抗体価の上昇をイースタンブロット法で確認した。

(3) ダイオウ配合医薬品中のセンノシド A, B の分析

漢方薬の顆粒剤は 100 mg に、錠剤は 1 錠に、各 10 mL の炭酸水素ナトリウム溶液 (1000) を加え、30 分間の超音波処理を行った。その後 1200 rpm、15 分間の遠心分離にて上清を試料とした。その後、競合的 ELISA 法およびイースタンブロット法により各種漢方薬中のセンノサイド A, B 含量を分析した。

4. 研究成果

(1) 各種フラボノイド配糖体に対するイースタンブロット法

カンゾウのリクイリチンに対する MAb の作製に成功し、抗リクイリチン MAb を一次抗体としたイースタンブロット法の開発に成功した。検出感度から生体内の微量なリクイリチン、リクイリチン アルブミン複合体を検出できることが示唆された。また、チンピのヘスペリジンに対する MAb の作製にも成功し、抗ヘスペリジン MAb を用いた超高感度なイースタンブロット法を開発した(図 2)。

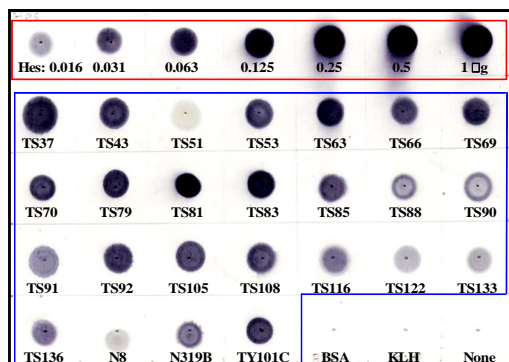


図 2 イースタンブロット法による漢方薬中のヘスペリジンの検出

フラボノイド配糖体は、腸内細菌で代謝され、肝臓で抱合反応を受ける生薬成分であり、カンゾウの偽アルドステロン症と同様に、これらの抱合化代謝産物が原因で各種副作用が生じるのではないかと考えている。今回確立したイースタンブロット法が原因物質を探求する際の強力なツールになり得ることが予測された。

(2) 間質性肺炎の副作用報告のある漢方薬に配合される生薬成分に対する MAb の作製

まず、ナルシシン BSA を抗原としてマウスへの免疫を行ったが、ナルシシンに対する抗体の誘導が認められなかった。そこで、ナルシシン KLH を免疫することで、マウス体内でのナルシシンに対する抗体誘導をマウス血清を一次抗体としたイースタンブロット法を用いて確認することに成功したが、実施期間内での抗ナルシシン MAb 作製には至らなかった。そこで、間質性肺炎の副作用報告のある漢方薬に配合される生薬の主要成分の内、テルペノイド化合物に着目し、サイコのサイコサポニン a、シャクヤクのペオニフロリンに対する MAb を用いたイースタンブロット法を化学発光法を用いて開発することに成功した。化学発光量とテルペノイド化合物量との間で良好な検量線が得られ、血中濃度や尿中排泄量を簡便に測定でき、さらには血清を一次抗体として、サイコサポニン a やペオニフロリンに対する抗体検出を可能とした(図 3, 4)。

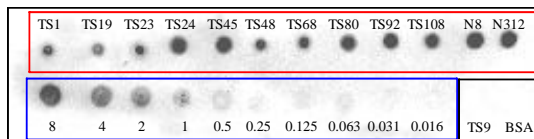


図 3 化学発光法を用いたイースタンブロット法による漢方薬中のペオニフロリンの検出

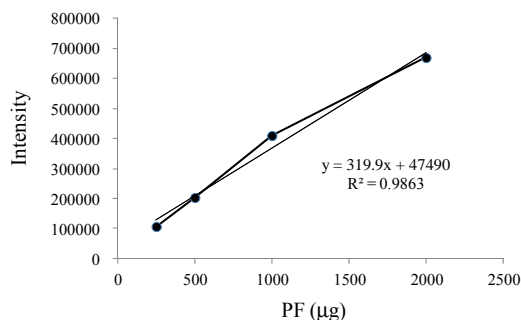


図 4 化学発光法によるペオニフロリンの検量線

(3) ダイオウ配合医薬品中のセンノシド A, B の分析

漢方薬の服用によるアレルギーには直接関係がないが、ダイオウ配合漢方薬の服用により、便秘症以外の者の下痢や服用中の母親からの授乳による乳児の下痢が副作用として報告されている。そこで、その原因物質であるセンノシド A, B についてダイオウ配合

医薬品の分析を実施した。抗センノシド A、B MAbs を用いた ELISA で 1 錠、1 包当たりのセンノシド A、B の定量分析を、イースタンプロット法でダイオウ配合医薬品中のセンノシド A、B の検出を行った。添付文書によると 1 日量の規定があるが、軽症～重症などに応じて幅を持って記載されているものもある。患者は、初回は添付文書に従って服用するが、その後は自分の判断で増減していることが多いため、1 錠、1 包当たりで評価することが現実的であると判断した。OTC でも武田薬品が自主開発した信州大黄を用いたタケダ漢方便秘薬は、処方医薬品であるツムラとオースギの 1 錠あたりは少ないものの、標準 1 日使用量が 6 錠であり、ツムラの 7.5g、オースギの 3.0g とセンノシド A、B の量ではほぼ同等となることが判明した。これらの結果より、1 錠または 1 包当たりのセンノシド A、B の含有量から下痢等の副作用を未然に防ぐ可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

岡崎啓介、山田春樹、森永 紀、大黄・センナ含有医薬品のセンノシド A・B 定量による刺激性下剤成分の評価、兵庫県医師会医学雑誌、査読有、59 巻、2017、32 - 36

<http://www.hyogo.med.or.jp/>

Shunsuke Fujii, Osamu Morinaga, Takuhiro Uto, Shuichi Nomura, Yukihiro Shoyama, 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, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 査読有, 64, 2016, 1087-1093

DOI: 10.1021/acs.jafc.5b04732.

〔学会発表〕(計 5 件)

森永 紀、イースタンプロット法を基盤とした生薬・漢方薬の科学的評価と生体内代謝研究への展開、日本薬学会九州支部大会、鹿児島、平成 28 年 12 月 3 日

森永 紀、宇都拓洋、正山征洋、抗ヘスperiジンモノクローナル抗体を用いたイースタンプロット法の開発、日本薬学会、神戸、平成 27 年 3 月 26 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等は、今後、さらなる研究成果が得られた時に掲載を行う。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森永 紀 (Osamu Morinaga)

第一薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60465771

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし