

機関番号：37303

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790030

研究課題名 (和文) イースタンブロットを用いた漢方薬のハイスループット分析法

研究課題名 (英文) Development of eastern blotting technique for high-throughput analysis of kampo medicines

研究代表者

森永 紀 (MORINAGA OSAMU)

長崎国際大学・薬学部・講師

研究者番号：60465771

研究成果の概要 (和文)：生薬成分の配糖体に対するモノクローナル抗体 (MAb) とイースタンブロット法 (低分子化合物である配糖体の免疫染色法) を利用して、漢方薬の網羅的解析法の開発を行った。その結果、イースタンブロット法を基盤として、dot blot 法と化学発光法を組み合わせることで、甘草のグリチルリチン (GC) と黄芩のバイカリン (BI) を迅速、簡便、高感度且つ特異的に検出できることに成功した。本法を漢方薬中の GC と BI の分析に応用したところ、HPLC 法や ELISA 法と同様に定量分析することが可能であり、漢方薬中の有効成分の網羅的定量分析が可能で有用な手法であることを確認した。

研究成果の概要 (英文)：We demonstrated the high-throughput analysis for natural glycosides in kampo medicines using monoclonal antibodies (MAbs) and eastern blotting technique. Then, rapid, simple, high-sensitive and specific detection system was developed for GC and BI by eastern blotting technique using dot blot and chemiluminescent methods. This methods was useful as the high-throughput analysis for the determination of active compounds in kampo medicines as well as HPLC and ELISA systems.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：化学系薬学

キーワード：イースタンブロット、モノクローナル抗体、漢方薬、配糖体、免疫染色

1. 研究開始当初の背景

平成 14 年度から医学部、薬学部のコアカリキュラムに漢方が盛り込まれ、漢方医学の教育がスタートした。新しい教育を受けた学生が卒業する時期から医療現場においても漢方薬の処方が増えるものと推察される。また近年の欧米における代替医療の進展、高齢社会への突入によるメタボリックシ

ンドロームの激増、慢性病への対応に伴い「未病を治す」をモットーとする漢方薬の需要は年々伸び続けている。しかし日本で生産される漢方薬の配合生薬の 90%以上は輸入に依存し、それら生薬の 70%は野生種で賄われているので、品質面が危惧されている。即ち、原料生薬の均質性が保証されない限り、漢方薬の薬効を一定に保つことは不可能で

ある。このために原料生薬の品質に関しては日本薬局方により厳しく規定されている。一方、2006年4月施行の第15改正日本薬局方においては、葛根湯、加味逍遙散、柴苓湯、大黃甘草湯、補中益氣湯および苓桂朮甘湯の6処方記載され、次回の改正時には20処方位まで増えると言われている。このことは現代医療における漢方薬の有用性が評価されたことを意味しており、大変重要な変革期に入ったと認識している。現在、漢方薬・生薬の確認試験および定量分析は薄相クロマトグラフィー (TLC) や高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で行うことが主流であるが、費やす有機溶媒の量や種類も多く、また、HPLC においては消耗品である分離カラムも高額であり、分析には専門的な知識を必要とする。これらを背景に漢方薬とその配合生薬の薬用成分の迅速・簡便・正確かつ環境に優しい分析法の開発がより重要となってきた。

2. 研究の目的

甘草 (カンゾウ) は、全漢方処方の約70%に配合される最も重要な生薬の1つであり、有効成分としてグリチルリチン (GC) を含んでいる。GCの定量分析法には、各種カラムや質量分析装置を組み合わせたHPLC法が一般的であるが、申請者はGCに対するモノクローナル抗体 (抗GC MAb) を用いたELISA法によるGCの定量分析の開発とその実用化を行ってきた。そこで本研究課題では、抗GC MAbを用いたイースタンブロット法を基盤としたGCの網羅的定量分析法を確立することを第一の目標とした。さらに、甘草と同様に漢方薬に配合される極めて重要な生薬である黄芩 (オウゴン) の有効成分であるバイカリン (BI) に対するイースタンブロット法の確立を行い、漢方薬中のBIのハイスループット分析を確立することも目標とした。漢方薬をはじめ、生薬原料の薬用植物の品質評価にも本法が有用であることを示し、HPLC法やELISA法にかわる新たな分析法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) Dot blot 法による GC の網羅的解析法の確立と評価

イースタンブロッティングを基盤とし、dot blot 法と抗 GC MAb を用いて GC の網羅的解析法の確立を行った。まず、ポリエーテルスルホン (PES) 膜上に直接 GC 標準溶液をスポットし、イースタンブロッティングと同様に、膜上で GC - BSA コンジュゲートを形成し、BSA を介して GC を膜上に固定化した。その後、抗 GC MAb を用いて抗原抗体反応を行い、酵素標識二次抗体、化学発光試薬と Luminescent Image Analyzer (LAS4000、GEヘルスケア) により GC の検出を行った。さ

らに各種漢方製剤の 0.1% NH₄OH - MeOH エキスを用いて、dot blot 法による各種漢方製剤に含まれる GC の検出を行い、漢方薬中の GC の特異的な検出法としての有用性を評価した。

(2) Image Quant TL を用いた GC の網羅的定量分析法の確立と評価

Dot blot 法による GC の網羅的定量分析を行うために、GC の化学発光量を解析ソフト (Image Quant TL) を用いて数値化し、GC の検量線の作成を行った。その後、得られた GC の検量線を用いて、各種漢方薬中に含まれる GC 含量の算出を行い、ELISA 法との定量値の相関を確認し、本法の有用性を評価した。

(3) BI に対するイースタンブロット法の確立と評価

TLC にて BI を展開後、加熱・加圧により TLC から PES 膜に BI を転写させた。過ヨウ素酸ナトリウム (NaIO₄) 処理後 BSA 溶液を添加し、膜上で BI-BSA コンジュゲートを形成し、BI を膜上に固定化させた。ブロッキング後、抗 BI MAb、酵素標識 2 次抗体、基質 (4-Cl-1-Naphthol) を順次添加し、発色法により BI を検出し、BI 検出のためのイースタンブロット法を確立した。さらに、生薬、漢方薬中の BI の検出を確認し、本法の有用性を評価した。

(4) BI のハイスループット分析法の確立と評価

PES 膜上にサンプルを直接スポットし、NaIO₄ 処理～酵素標識 2 次抗体の操作を行い、その後、化学発光試薬と Luminescent Image Analyzer を用いて BI のハイスループット分析法の確立を行った。また発光量を数値化することで漢方エキス中の BI の定量分析への可能性も評価した。

4. 研究成果

(1) Dot blot 法を用いた免疫化学発光法による GC の網羅的定量分析法の確立

申請者は抗 GC MAb を用いた ELISA 法による GC の定量分析の開発とその実用化 (グリチルリチン ELISA キット (Wako)) を行ってきた。さらに TLC の替りに PES 膜を用いて、GC を展開・分離し、直接膜上で免疫染色を行い、NIH Image 画像解析ソフトを用いた GC の定量分析にも成功している (*Anal. Bioanal. Chem.*, 383, 668-672 (2005))。しかし、TLC や PES 膜による GC の展開・分離には有機溶媒を使用し、時間を要し、多検体の一斉検出に適した方法とは言い難い。そこで本申請課題では、抗 GC MAb を用いたイースタンブロット法を基盤として、dot blot 法と免疫化学発光法を組み合わせ、成分の展開・分離、膜への転写を必要としない GC の超高感度な網

羅的解析法 (GC のハイスルーブット分析) について検討を行った。その結果、甘草を配合生薬として含む漢方薬では、GC の明確な化学発光が認められた (図 1、レーン I - IX)。一方、BSA と甘草を含まない半夏厚朴湯では化学発光は認められなかった (図 1、レーン X - XI)。

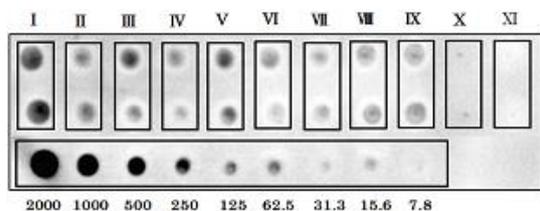


図 1. Dot blot 法を用いた免疫化学発光法による各種漢方薬中の GC の検出

次に、GC の発光スポットを、解析ソフト (Image Quant TL) を用いて数値化し、GC の検量線の作成について検討を行った。その結果、GC 量 15.6 ng ~ 1000 ng において、良好な直線性が得られ、dot blot 法による GC の検量線の作成が可能となった。また、基質として 4-クロロ-1-ナフトールを用いた免疫発色法では、GC 量 500 ng を検出限界とするのに対し、免疫化学発光法を用いた場合は、GC 量 3.9 ng の検出限界であり、検出感度が 100 倍以上改善され、超高感度な GC の定量分析が可能であることが確認された。

そこで作成した検量線を使用して各種漢方薬中の GC 含量を求め、ELISA による定量値との比較を行った (表 1)。その結果、両者の値は良く近似しており、dot blot 法を用いた免疫化学発光法による GC の網羅的定量分析が可能であることが明らかとなった。

表 1. 各種漢方薬中の GC の含量

Sample	Contents (µg/mg dry wt.)	
	Dot blot	ELISA
葛根湯	3.87 ± 0.15	3.96 ± 0.47
安中散	1.82 ± 0.27	1.75 ± 0.31
加味逍遙散	1.85 ± 0.67	1.42 ± 0.15
麦門冬湯	0.92 ± 0.16	0.98 ± 0.02
十全大補湯	2.09 ± 0.31	2.06 ± 0.26
潤腸湯	1.06 ± 0.26	1.96 ± 0.20
薏苡仁湯	1.19 ± 0.27	1.09 ± 0.08
平胃散	1.93 ± 0.44	1.43 ± 0.18
柴胡清肝湯	1.63 ± 0.03	1.85 ± 0.26
半夏厚朴湯	N.D.	N.D.

(2) BI に対するイースタンブロット法の開発とハイスルーブット分析への応用

BI は黄芩に最も多く含まれるフラボノイドで、抗アレルギー、抗炎症、抗がん、抗酸化作用等が報告されている。本申請課題では、まず、抗 BI MAb を用いた ELISA 法により、各種黄芩、漢方薬中に含まれる BI の定量分析を行った (表 2)。

表 2. 各種黄芩、漢方薬中の BI の含量

Sample name	BI (µg/mg dry wt.)
1. <i>Sucutellariae radix</i> main root	74.2 ± 7.8
2. <i>S. radix</i> A	126.6 ± 17.3
3. <i>S. radix</i> B	177.8 ± 6.1
4. <i>S. radix</i> C	80.4 ± 10.0
5. <i>Shosaikoto</i>	29.0 ± 4.7
6. <i>Saikokaryukotsuboreito</i>	9.2 ± 1.1
7. <i>Shakuyakukanzoto</i>	ND

次に、BI に対するイースタンブロット法を確立し、免疫組織染色への応用を行った。さらに、dot blot 法を用いた免疫化学発光法による BI の定性・定量分析への応用について検討を行った。その結果、図 2 に示すように TLC で生薬・漢方薬を展開・分離後、PES 膜へ転写し、抗 BI MAb を用いて BI を特異的に免疫染色出来るイースタンブロット法の確立に成功した。

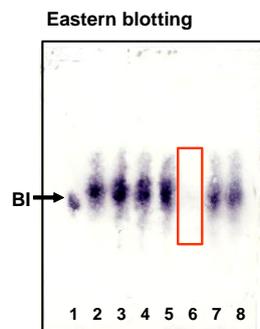


図 2. イースタンブロット法による生薬・漢方薬中の BI の免疫染色

また、本法を免疫組織染色へ応用し、新鮮黄芩の根に含まれる BI の分布を調べたところ、図 3 の B の皮層部分の染色が強く、この結果は ELISA 法による木部 (A) と皮層 (B) それぞれにおける BI の定量値とよく近似していた。さらに、dot blot 法と免疫化学発光法を組み合わせ、BI のハイスルーブット分析について検討を行った。その結果、黄芩を配

合生薬として含む漢方薬では、BI の明確な化学発光が認められ (図 4)、ELISA 法による定量値と良く近似しており、BI のハイスループット分析が可能であることが示唆された。

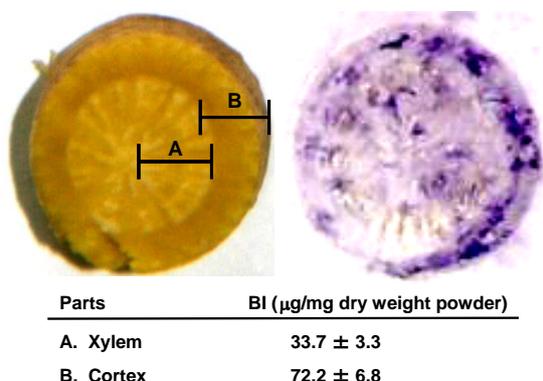


図 3. 新鮮黄芩根における BI の分布

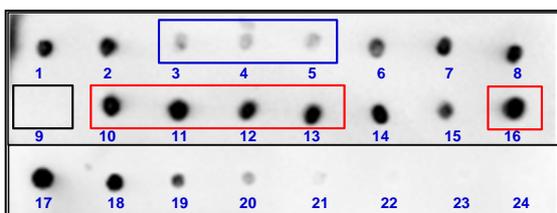


図 4. Dot blot 法を用いた免疫化学発光法による各種漢方薬中の BI の検出

(3) 結論

一般に天然有機化合物の分析には HPLC、ガスクロマトグラフィー等の機器が使用されているが、微量成分でかつ多数のサンプル分析には適切な方法とは言い難い。そこで本研究では、GC 及び BI に対してそれぞれ特異的な MAb を用いた競合的 ELISA 法により各種漢方薬中の GC 及び BI の定量分析を行った。その結果、ELISA 法は特別な前処理を必要とせず、簡便性、迅速性に優れていることから、生薬及び漢方薬の品質管理に有用であることが示唆された。

また、植物の二次代謝成分である配糖体等の低分子化合物に対しては、TLC を用いて分離し、硫酸等を用いて発色させる方法が一般的であるが、多数のスポットが見られ、GC 及び BI に対する特異的な検出方法とは言い難い。そこで、本研究では、膜上で低分子化合物の染色を可能としたイースタンブロット法と、その応用である dot blot 法及び化学発光法により、各種サンプル中の GC 及び BI を網羅的に解析する方法を試みた。これらの手法を用いることで、成分の展開・分離、

膜への転写を必要としない GC 及び BI の高感度な網羅的解析が可能となり、特に化学発光法は、従来法 (発色法) と比較すると約 100 倍高感度な検出が可能であった。また採取したコガネバナ主根中の BI の分布を、イースタンブロットを用いて直接確認することも可能であった。

更に、化学発光法により検出された GC 及び BI は、その発光量を解析ソフトにより数値化を行うことで、良好な検量線を得ることができた。また、各種漢方薬に対して網羅的解析を行い得られた発光量と、同サンプル中の競合的 ELISA 法により定量した GC 及び BI には相関がみられた。このことから、dot blot 法と化学発光法を組み合わせることで、生薬や漢方薬に含まれる GC 及び BI の網羅的解析法として威力を発揮し、定量分析への応用も可能であることが示唆され、微量成分の検出や成分組成から含有植物などの同定を行うハイスループットスクリーニングへの応用、さらには医療現場への展開が期待される。

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 3 件)

- ① Osamu Morinaga, Yukihiro Shoyama, Development of new staining technology “eastern blotting” using monoclonal antibody, *Curr Drug Discov Technol*, 査読有、8 巻、2011、42-50
- ② Osamu Morinaga, Takuhiro Uto, Chun-Su Yuan, Hiroyuki Tanaka, Yukihiro Shoyama, Evaluation of a new eastern blotting technique for the analysis of ginsenoside Re in American ginseng berry pulp extracts, *Fitoterapia*, 査読有、81 巻、2010、284-288

[学会発表] (計 7 件)

- ① 森永紀、藤井俊輔、Halermat Suktap、迎涼、宇都拓洋、田中宏幸、正山征洋、イースタンブロットを用いた漢方薬のハイスループット分析法、日本薬学会、第 131 年会、静岡、平成 23 年 3 月 31 日
- ② 迎涼、宇都拓洋、森永紀、正山征洋、バカリに対するイースタンブロット法の開発と定性・定量分析への応用、日本薬学会九州支部大会、第 27 回、長崎、平成 22 年 12 月 11 日
- ③ 藤井俊輔、森永紀、正山征洋、グリチルリチン特異的抗体と化学発光法を用いたグリチルリチンの新規定量分析法の開発、日本生薬学会、第 57 年会、徳島、平成 22 年 9 月 25 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：<http://www.niu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森永 紀 (MORINAGA OSAMU)

長崎国際大学・薬学部・講師

研究者番号：60465771