

2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

— 調査・共同研究に対する助成 —

14年 3月 23日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究代表者氏名 正山 征洋
所属機関名 九州大学大学院
部署・役職 薬学研究院薬用資源制御学・教授
〒812-8582
所在地 福岡市東区馬出三丁目一番一号
電話 092-642-6580 内線

1. 研究テーマ 漢方薬の活性成分に関する共同研究

2. 研究期間 自 2001年 4月 / 日 ~ 至 2002年 3月 15日

3. 研究組織

日本側研究者氏名 正山 征洋
所属機関 九州大学大学院 職名 教授

中国側研究者氏名 徐 強
所属機関 中国薬科大学中薬学院 職名 教授

4. 研究報告書

別紙報告書作成要領に従い、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

5. 収支決算報告

2001年4月4日交付通知のあった研究課題 漢方薬の活性成分に関する共同研究

についての収支決算を行ないました。領収書コピーを添えて、次のとおり報告します。

交付を受けた金額	支 出 内 訳			
	消耗品費	旅 費	そ の 他	合 計
1,000,000 円	999,500 円	0 円	500 円	1,000,000 円

支出明細（消耗品・旅費・その他の科目別に記載、別紙可）

科目区分	金 額	備考（用途・内訳）
消耗品 エッペンドルフ 可変ピペット	納品書に記載	抗体分析に使用
ハミルトン マイクロシリンジ	納品書に記載	HPLC分析用
凍結乾燥瓶	納品書に記載	抗体タンパクの凍結乾燥用
ナスフラスコ	納品書に記載	抗体タンパクの凍結乾燥用
クオリテーチップ	納品書に記載	抗体分析用（ディスプレイ）
チューブラック	納品書に記載	チューブの保存用
ホキメディカル	納品書に記載	抗体分析用
スクリュー キャップ マイクロ チューブ	納品書に記載	抗体タンパクの保存用
組織培養用 マイクロチューブ	納品書に記載	ハイブリドーマの培養
その他	500	データ整理等

漢方薬の活性成分に関する共同研究

研究者氏名	徐 強
中国所属機関	中国薬科大学中薬学院
日本研究機関	九州大学大学院薬学研究院
指導責任者	正山征洋

要旨

生薬や漢方薬の主要成分の定量分析にモノクローナル抗体を用いた酵素免疫学的手法(ELISA)の開発を目的として、人参のジンセノシド類、甘草のグリチルリチン、柴胡のサイコサポニン類、大黄のセンノシド類に対するモノクローナル抗体を作成した。本抗体を用いた定性的な手法として世界に先駆けてイースタンプロテイング法を開発した。さらに本研究ではモノクローナル抗体装着イムノアフィニティーカラムにより人参の有効成分の一つであるジンセノシドR b 1の濃縮とワンステップ精製を行い単離することに成功した。また、ジンセノシドR b 1のみを除去したエキスの調整にも成功した。

Key Words 漢方薬, 生薬, モノクローナル抗体, ELISA, イースタンプロテイング, イムノアフィニティーカラム

緒言：

漢方薬や生薬の力価を評価する場合、活性成分をマーカーとして分析することが多い。この場合特定の化合物をターゲットとする分析と、類似した化合物群をトータルで分析する場合がある。我々は簡便な分析のツールとして、モノクローナル抗体を選び研究を展開している。即ち、生薬や漢方薬の主要成分の定量分析にモノクローナル抗体を用いた酵素免疫学的手法(ELISA)を開発してきた。また、定性的な手法として膜に転写してモノクローナル抗体により染色する新しい手法を開発し、イースタンプロテイング法と命名した。また、漢方薬には数種の生薬が配合されるため、真の活性成分についての研究は殆ど手が付けられていないのが現状である。これは生薬に多種多様な成分を含有するため、特定の成分だけを除去して薬理活性を検討することは不可能と考えられてきた。このため本研究ではモノクローナル抗体装着イムノアフィニティーカラムを作成し、ワンステップでターゲット成分を単離出来る方法を開発し、この結果により生薬エキスからターゲット成分のみを除去したエキスの調整を目指している。

方法：

1. モノクローナル抗体の作製とELISAの開発

1) 生薬成分の内タンパクや多糖類を除いては抗原と成りえないので、生薬成分にキャリアタンパクを結合して抗原性を付与する。通常は牛や人の血清アルブミンを用いる。結合体の中の生薬成分の分子数を確認後、マウスに免疫する。免疫値が上昇した後、脾臓細胞を摘出して、培養ミエローマ細胞と融合する。選択培地で培養し、融合細胞(ハイブリドーマ)のみを、また、目的とするモノクローナル抗体のみを分泌する単一のハイブリドーマをクローニングする。

2) 96穴のマイクロプレートに、生薬成分と抗原を作製したキャリアタンパクとは異なるタンパクを結合した固相化抗原を吸着し、得られたモノクローナル抗体とフリーの抗原を加えて抗原抗体反応を行う。洗浄後酵素でラベルした2次抗体を加え、酵素の基質を加えて反応し、発色の度合いを吸光光度計で測定する。

別に標品を用いて検量線を作製して成分含量を算出する。

2. イースタンプロテイングの開発と生薬の鑑定と漢方薬の定性

TLCで展開後PVDF膜をカバーしプロテイング液を噴霧、120°C、5秒間加熱。膜をNaIO₄

溶液で処理後、モノクローナル抗体、2次抗体、基質の順に添加、反応して染色する。

3. モノクローナル抗体装着イムノアフィニティーカラムの作製とワンステップ単離

モノクローナル抗体の糖鎖部分を NaIO_4 で開環し、ヒドラジン修飾アガロースゲルと反応してモノクローナル抗体装着イムノアフィニティーカラムを作製。洗浄溶液にて夾雑物を除去、溶出溶液にてターゲット化合物を溶出。

結果：

1. モノクローナル抗体の作成とELISAの開発

人参のジンセノシドR B 1, R G 1, 柴胡のサイコサポニン類, 大黃のセンノシド類, 甘草のグリチルリチン, サフランのクロシン, 芍薬のペオニフロリン等各種の配糖体に対するモノクローナル抗体の作成に成功した。これらの内人参のジンセノシドR b 1について詳細に説明する。

図1が抗ジンセノシドR b 1モノクローナル抗体を用いたジンセノシドR b 1に対する検量線である。2 ng - 100 ng/mlの範囲で良好な直線性を示すことから、この範囲内で精度の高い分析が可能となった。

表1は抗ジンセノシドR b 1モノクローナル抗体のクロスリアクションを示す。この結果類似化合物であるジンセノシドR cとR dにわずかにクロスリアクションが認められるものの、その他の成分に対してはクロスリアクションは認められなかった。このことから抗ジンセノシドR b 1モノクローナル抗体は極めて特異性の高い抗体と言える。

表2は各種の漢方薬中のジンセノシドR b 1含量を分析した結果である。全ての人参配合漢方薬からはジンセノシドR b 1が検出された。一方、人参を配合していない漢方薬にはジンセノシドR b 1は検出出来なかった。

2. イースタンプロテインゲの開発と生薬と漢方薬の鑑定

図2は抗ジンセノシドR b 1モノクローナル抗体を用いて各種人参エキスのイースタンプロテインゲを行ったものである。左のTLCでは全ての化合物が発色しているが、右のイースタンプロテインゲではジンセノシド類のみが発色しており、本法が各種人参の鑑定に極めて有用であることが明らかになった。

3. モノクローナル抗体装着イムノアフィニティーカラムの作製とワンステップ単離

図3は人参エキスを抗ジンセノシドR b 1モノクローナル抗体装着イムノアフィニティーカラムに付し、洗浄液で洗浄し続いて溶離液で溶出したもので、ELISAによりモニターしたものである。洗浄液では過剰のジンセノシドR b 1と他の化合物が溶出している。洗浄後溶離液によりジンセノシドR b 1が溶出している。この状況を先のイースタンプロテインゲにより確認したのが図4である。左がTLCで、右がイースタンプロテインゲである。洗浄液には過剰のジンセノシドR b 1と色々な成分が溶出している。一方溶離液によりジンセノシドR b 1のみが溶出している。この結果モノクローナル抗体装着イムノアフィニティーカラムによりワンステップでジンセノシドR b 1を単離することが可能なことを明らかにした。

考察：

生薬成分として人参のジンセノシドR B 1, R G 1, , 柴胡のサイコサポニン類, 大黃のセンノシド類, 甘草のグリチルリチン, *Solanum*属のソラソジン配糖体, サフランのクロシン, 芍薬のペオニフロリン, ウマノスズクサ科の副作用成分であるアリストロキア酸, イチョウ葉の副作用成分, ギンコリン酸等に対するモノクローナル抗体を作製し、ELISAによる高感度定量法を樹立した。これらハイブドローマは半永久的に保存が可能で、一度作製すれば長年月同一の力値を持つMAbを供給出来る利点がある。また、本法は何等前処理は必要なく、HPLCのような高価な装置も必要とせず、装置としては安価なプレートリーダーのみである。さらに通常のHPLCに比べ数十倍から数百倍の感度である。また、HPLCが有機溶媒を必要とするが、本法では有機溶媒を必要とせず、環境に優しい分析法と考えている。また、一度に沢山のサンプルを分析出来る利点もあり、次世代の手法と言えよう。

一方イースタンプロテインゲ法は世界で最初の例で、特に配糖体に特異的な手法である。通常は生

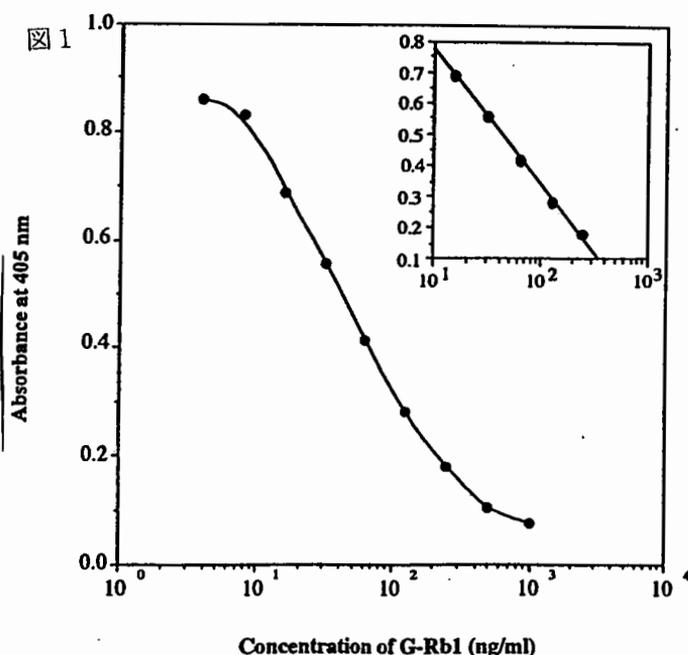
薬の配糖体含量が低く、分析の主体をなす TLC 分析には種々の前処理を必要とするが、本法は何等処理せずに感度良く配糖体パターンを表現出来る。また、本法は生薬中の分析のみならず、生体における生薬成分の動態をも検出出来る簡便な手法として多くの分野で取り入れられるものと推察される。

モノクローナル抗体装着イムノアフィニティーカラムはワンステップ単離を可能にすることが明らかとなった。図5は人参エキスを精製したものである。エキスをカラムに添加するとジンセノシド R b 1 のみがカラムに結合する (1)。完全にジンセノシド R b 1 を除去したエキス (2) を再度カラムで精製すると、ジンセノシド R c, R d がカラムに結合する (5)。このように繰り返しカラムにて精製することで3位に糖を持つ 20 S-パナクサジオール系ジンセノシドの単離が可能と考える。また、アフィニティーカラムを用いて特定のジンセノシドを除去したエキス (2, 4) を得ることに成功した。この分離エキスは元のエキスの薬理活性と比較することにより、生薬中での除去した成分単独の薬理活性が明らかになるものと期待している。

発表論文：

- 1 W.Putalun, H.Tanaka, Y.Shoyama, TLC immunostaining of steroidal alkaloid glycosides, *Encyclo.Chromatog.*, 849-851(2001)
- 2 H.Tanaka, Y.Shoyama, Forskolin purification using an immunoaffinity column combined with an anti-forskolin monoclonal antibody, *Encyclo. Chromatog.*, 352-354(2001)
- 3 S.J.Shan, H.Tanaka, J.Hayashi, Y.Shoyama, Western blotting of glycyrrhetic acid glucuronides using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody, *L.Liq.Chrom.Rel.Technol.*, 24(10), 1491-1499(2001)
- 4 N.Fukuda, H.Tanaka, Y.Shoyama, Double staining of ginsenosides by western blotting using anti-ginsenoside Rb1 and Rg1 monoclonal antibodies, *Biol.Pharm.Bull.*, 24(10), 1157-1160(2001)
- 5 H.Tanaka, L.J.Xan, S.Morimoto, Y.Shoyama, R.Isobe, K.Nojima, Direct determination of naturally occurring biologically active compound-serum albumin conjugate by MALDI-Mass, Spectroscopy, 15, 1-18(2001)
- 6 O.Morinaga, S.Nakajima, H.Tanaka, Y.Shoyama, Production of monoclonal antibodies against a major purgative component, sennoside B, their characterization and use in ELISA, *Analyst*, 126, 1372-1376(2001)
- 7 S.J.Shan, H.Tanaka, Y.Shoyama, Enzyme-linked immunosorbent assay for glycyrrhizin using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody and a new eastern blotting for glucuronides of glycyrrhetic acid, *Anal.Chem.*, 73 (24), 5784-5790(2001)
- 8 W.Putalun, H.Tanaka, Y.Shoyama, Distribution of solasodine glycosides in *Solanum khasianum* fruiting stage determined by ELISA and western blotting, *Natural Med.*, 55(5),243-246(2001)

表 1



Compound	Cross-reactivities (%)
Ginsenoside Rb1	100
Ginsenoside Rc	0.024
Ginsenoside Rd	0.020
Ginsenoside Re	<0.005
Ginsenoside Rg1	<0.005
Glycyrrhizin	<0.005
Gigitonin	<0.005
Tigogenin	<0.005
Tigonin	<0.005
Gitogenin	<0.005
Digitonin	<0.005
Solamargine	<0.005
Solasonine	<0.005
Cholesterol	<0.005
Ergosterol	<0.005
Ursolic acid	<0.005
β -Sitosterol	<0.005
Cholic acid	<0.005
Deoxycholic acid	<0.005

表 2

Sample No	Sample	Composition ratio ^a	Measured amount (mg/g dry wt.)	Expected amount ^b (mg/g dry wt.)
1	柴苓湯	3/40	0.42±0.03	0.41
2	釣藤散	2/28	0.38±0.01	0.39
3	白虎加人參湯	1.5/31.5	0.25±0.01	0.26
4	半夏瀉心湯	2.5/18.5	0.71±0.01	0.74
5	小柴胡湯	3/24	0.64±0.01	0.69
6	補中益氣湯	4/24	1.14±0.10	0.92
7	柴朴湯	3/34	0.60±0.01	0.48
8	四君子湯	4/15	1.71±0.08	1.46
9	六君子湯	4/21.5	0.90±0.07	1.02
10	人參湯	3/12	0.93±0.04	1.37
11	柴胡桂枝湯	2/22	0.34±0.02	0.50
12	溫經湯	2/27	0.28±0.01	0.41
13	大黃甘草湯	0/6	ND	ND
14	桔梗湯	0/5	ND	ND

Data were mean±SE from triplicate determinations. ND= not detectable.

^a Composition ratio expresses the contents of ginseng(g) used in each prescription.

^b The amounts of G-Rb1 were calculated from the composition of ginseng and the standardized G-Rb1 content (5.49 mg/g dry wt. in ginseng) determined by ELISA.

圖 2

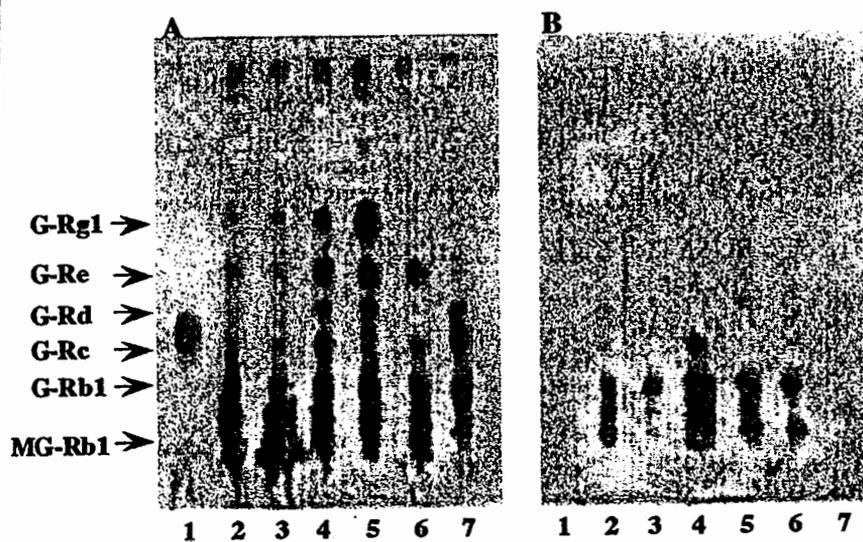


图 3

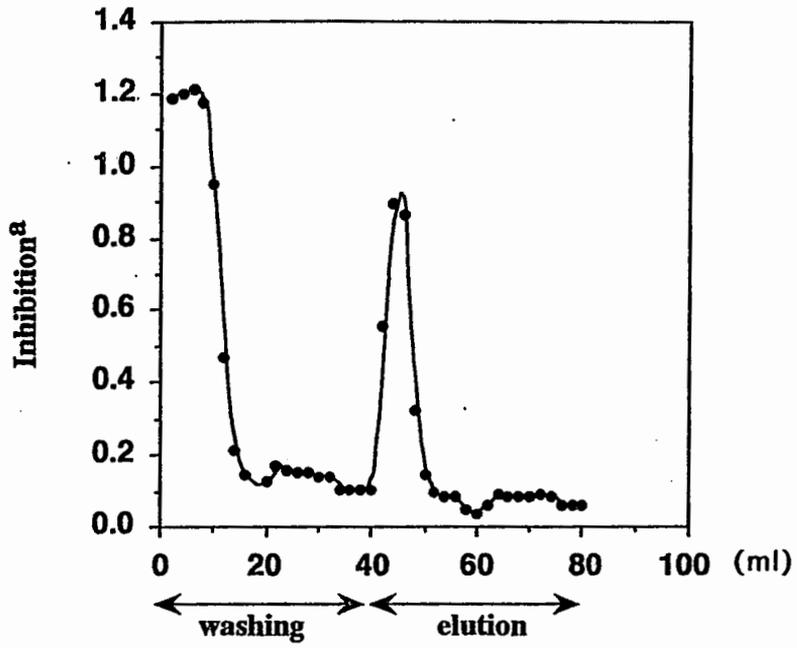


图 4

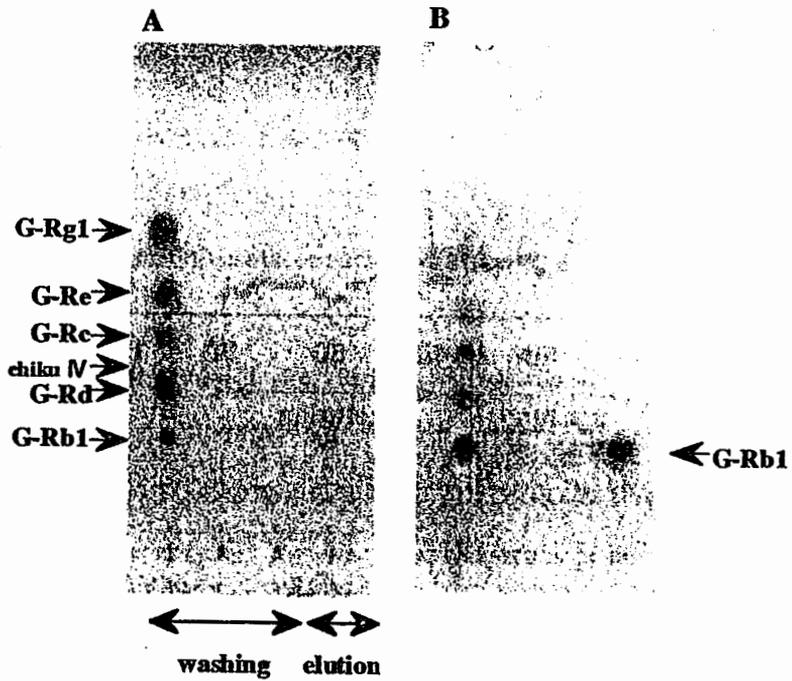


图 5

