

中医学領域における モノクローナル抗体研究

長崎国際大学薬学部 正山征洋

要旨

中医学と西洋薬の分岐点はスイス人のパラシユウスが天然薬物には「薬物の精」（有効成分）があるとの講演を行った16世紀にさかのぼる。西洋薬はこの考え方を継承し、19世紀モルヒネをはじめ多くのアルカロイドを精製・結晶化して医薬品とした。一方、中医学・漢方薬にも有効成分があることは間違いないが、多成分系のため研究推進が困難で多くがベールに包まれたままである。われわれは中医学・漢方薬の活性成分探求のツールとしてモノクローナル抗体（MAb）を選んだ。重要生薬の主要成分に対するMAbを作成しており現在では30種以上に達している。これらMAbを応用して以下に示す新しい手法を開発した。

1. サザン、ノーザン、ウエスタンに次ぐ「イースタンプロット法」の開発

最も頻度高く中医学・漢方薬に配合される生薬は甘草で、330種にのぼる成分が確認されており、そのなかでグリチルリチン（GC）が主有効成分である。GCは甘草から精製・単離されGC製剤として肝炎や抗アレルギー剤として市販されている。甘草のなかのGCを分析する必要性は高いが、前述のとおり多成分が混在しているのでその分析は煩雑である。そこでGCに対するMAbを作成し簡便で再現性の良好な分析法を開発した。さらにMAbを用いて、甘草、中医学・漢方薬、血清中のGCのみを発色する方法を開発し、「イースタンプロット法」と命名した。

2. 「ノックアウトエキス」の調整と活性成分の特定

甘草の活性成分がGCのみとは断定できない。そこで甘草エキスから抗GCMAbを結合した抗体カラムによりGCのみを除去したエキスの作成に成功した。本エキスを「ノックアウトエキス」と命名し、本エキスと甘草の粗エキスの活性を比較した。この結果、GCのみで活性を示すのではなく、GCと他成分が共同して活性を示すものと推測するに至った。

3. 小型化抗体遺伝子を用いた「ミサイルタイプの分子育種」

GCのように複雑な構造をもつ化合物の化学合成は極めて困難で、実用に供することは不可能である。このため天然物に資源を求めて医薬品開発が行われてきた。天然化合物の含量を高めることは医薬品の生産性向上に資するため、高含量化を求めた育種研究が行われてきた。近年、生合成酵素遺伝子の操作により含量を向上する試みがなされてきたが成功には至っていない。

われわれは、MAbの内抗原抗体反応に必須なvH, vLと呼ばれる部分のみをクローニングし、リンカーと呼ばれる紐状のペプチド遺伝子で結合した小型化抗体（scFv）遺伝子を作成した。このものを宿主植物へ導入することにより元の植物に比べ約3倍の含有量に上昇した。本法は臨床の場で行われている中和抗体に相当するもので、実用性の高い手法といえる。

連絡先：正山 征洋 〒 859-3298 長崎県佐世保市ハウステンボス町 2825-7 長崎国際大学

はじめに

中医薬には多くの生薬が配合されるが、それら原料生薬はすべてが天産物であるため均質とは限らず、したがって品質評価が求められ、通常は液体クロマト(HPLC)によるマーカー成分の定性・定量が行われる。HPLCは前処理が必要で、分析に時間を要し、有機溶媒を使用する等のデメリットがある。このためわれわれはモノクローナル抗体(MAb)を用いた簡便でスピーディな、前処理が不要な、かつ有機溶媒を用いない環境に優しい生薬の評価法を確立している。そのなかで配糖体類の検出法としてイースタンブロッティングと命名した手法を紹介する。また、生薬成分のなかの一つの成分のみを除いたノックアウトエキスの作成法とその応用についても紹介する。

イースタンブロッティング

高分子化合物に対するウエスタンブロッティングは必須のツールであるが、低分子化合物に対しては不可能と考えられてきた。われわれは solasodine 配糖体に対してウエスタンブロッティングに準じた染色に初めて成功し¹⁾、イースタンブロッティングと命名した²⁾。本稿では人参サポニン(ginsenoside類)について説明する。

2枚の薄層クロマト(TLC)を用いて人参粗エキスを n-BuOH-EtOAc-H₂O 系展開溶媒で展開する。1枚の TLC に吸着膜(PVDF膜)を被い、ブロッティング液を噴霧後数十秒間 120℃程度の熱をかけると全成分が膜へと移行する。しかしこのままの状態だと洗浄操作中にサポニンは流失して発色するには至らない。そこで膜を NaIO₄ 液と処理することによりサポニンの糖鎖を酸化的に開環する。そこへタンパクを加えシッフベースを形成し膜への吸着能を付与する。次に抗 ginsenoside Rb1 (G-Rb1) MAb で処理し、標識 2 次抗体、基質を順次添加して反応することにより G-Rb1 が発色することを見出した。

人参のサポニンにはプロトパナクサジオール(PPD)系とプロトパナクサトリオール(PPT)系があり、それぞれ特徴のある薬理活性を有しているため、各種人参の薬効を予測するためにもどちらの系のサポニンが多く含有するのかを調査する必要がある。また、資源探索を人参以外の植物に求める場合もある。

抗 G-Rb1 MAb と ginsenoside Rg1 (G-Rg1) MAb により 2 種類の基質を用いて 2 重染色を行ったところ、PPD 系が青紫色で PPT 系が赤色に染色された(図 1)³⁾。なお、左はシリカゲル TLC を硫酸で発色したもので各 ginsenoside による発色の違いは認められない。右図の 2 重染色のプロファイルから次のような情報が得られる。

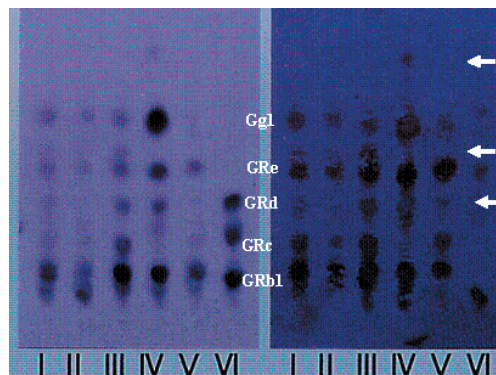


図 1
各種人参の
イースタンブロッティング

1. 青紫色スポットは PPD 系の ginsenoside 類である。
2. 赤く発色しているスポットは PPT 系の ginsenoside 類である。
3. Rf 値から結合している糖の数を類推することが可能。
4. 人参の種類によって ginsenoside 類の含量が異なっており, IV (田七人参) は G-Rg1 含量が高く, V (アメリカ人参) は ginsenoside Re が多い特異な人参で, VI (竹節人参) は ginsenoside 類含量の低い人参である。

以上の情報をもとに矢印を付けた 3 種のマイナーな ginsenoside 類についてその構造を推定した。赤色からいずれもアグリコンは PPT である。Rf が一番高い ginsenoside は 2 糖である ginsenoside Rg1 よりも糖の数が少ないことから, 1 糖の ginsenoside Rh1 と推定できる。真ん中の ginsenoside は 2 つの糖をもっていることが容易に推察される。一番下の矢印は 3 糖をもつ ginsenoside といえる。これらのデータと文献との比較検討から, 上から ginsenoside Rh1, ginsenoside Rf および 20-gluco-ginsenoside Rf であることが明らかとなった。以上のように色彩と Rf 値を比較検討することによりアグリコンがいずれの系に属し, 糖鎖がどれだけのサポニンであるかということが簡単に予測され, 構造決定に費やすエネルギーが格段に少なくなるであろう。

図 2 は人参のスライスのイースタンプロットである。G-Rb1 は周皮に近いところに多く分布し内部の柔組織には含量が少ないことがわかる。

人参のほかに大黄の sennoside 類, Solanum 属植物の solasodine 配糖体, 甘草の glycyrrhizin, 柴胡の saikosaponin 類についても同様に配糖体の分布状況を知ることができる方法を開発した。

■ ノックアウトエキス

本稿では分子量の 1,000 以下の化合物について取り上げてみることにする。天然物には多数の類似化合物が混在するため, 精製には通常のカラムクロマトを繰り返すか, HPLC 等で繰り返し精製・分取するほかに手だてがない。このような天然物の一例として前述の ginsenoside 類について触れる。

上記の抗 G-Rb1MAb をアガロースゲルに結合し, イムノアフィニティーゲルを作製, カラムに充填しイムノアフィニティークロマトグラフィーを作製した。このものを用いて適切な溶離液で溶出することにより G-Rb1 のワンステップ単離を可能とした⁴⁾。

人参の粗エキスをイムノアフィニティークロマトグラフィーに付しバッファー

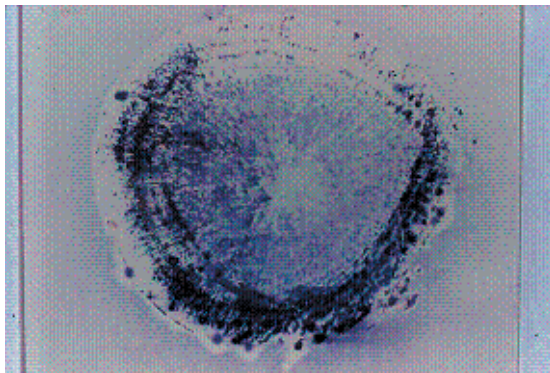


図 2
人参スライスの
イースタンプロット

中で抗原抗体反応を行う。この間に G-Rb1 はカラムの抗体部分へ結合する。洗浄溶媒として調製した食塩含有フォスフェートバッファーで洗浄すると大過剰の G-Rb1 とそれ以外の成分が溶出する。洗浄が完了した後にイソチアン酸カリとメタノールを含有する酢酸バッファーを溶出溶媒として溶出するとワンピークとして溶出してくる。この溶出パターンを上述のイースタンプロットで検証すると、洗浄フラクションにはオーバーチャージの G-Rb1 や他の ginsenoside 類、さらにアグリコンの異なるサポニン類も溶出している。

一方、溶出フラクションには G-Rb1 が溶出している。40 種以上存在する人参サポニンの中から特定の成分を単離することは容易ではないが、本法は純粋なサンプルが必要なときに調整可能である。また ginsenoside の定量に ELISA を実施しているが、人参サポニン投与後の血清中の含量はごく微量である。かかる場合もアフィニティーカラムにより濃縮後 ELISA による定量が可能である。なお、本カラムは 10 回程度の使用による活性の低下はなく連続使用を可能とする。前述の洗浄溶媒で溶出する画分を繰り返し精製することにより ginsenoside Rc と Rd が分離することが明らかとなった。これは両者がそれぞれ 0.024, 0.02 というわずかな cross-reactivity をもつことから他の成分と分離したものと考えられる。ここにも MAb の威力を感じずにはいられない。

上記のフラクションを別な観点から眺めてみると、洗浄フラクションと溶出フラクションを比較したのが図 3 である。ライン 1 は人参粗エキスである。ライン 2 は洗浄フラクションである。ライン 3 は上記の通りワンステップで単離した G-Rb1 である。粗エキスと洗浄フラクションを比較すると、洗浄フラクションには G-Rb1 のみが除かれていることがわかる。これはあたかもノックアウト遺伝子を彷彿させる。このため本フラクションをノックアウトエキスと命名した。このようなエキスの調整は通常は不可能である。すなわち各種クロマトを繰り返し

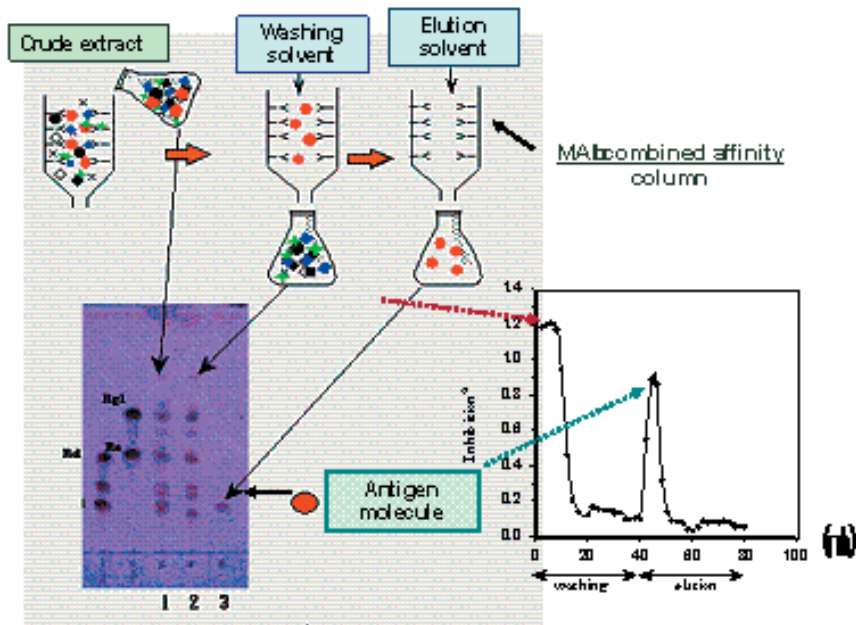


図 3 抗原分子のワンステップ単離とノックアウトエキスの調整

ていると組成が変わり真のノックアウトエキスは得られない。本ノックアウトエキスは真の活性成分を探索する場合に重要な役割を果たすことは明らかである。

■ おわりに

本稿では MAb を生薬の品質評価に応用する手法としてイースタンプロットを紹介した。また、有効成分の探索に威力を発揮するノックアウトエキスについても述べた。もう一つの応用として、薬用植物の育種という観点から小型化抗体遺伝子を宿主植物へ導入することにより抗原分子が増量することを明らかにし、ミサイルタイプ分子育種法と命名している。本法については紙面の関係上割愛したので、次の機会に紹介することとする。

引用文献

- 1) H Tanaka, W Putalun, C Tsuzaki et al : A simple determination of steroidal alkaloid glycosides by thin-layer chromatography immunostaining using monoclonal antibody against solamargine. *FEBS Lett* 404 : 279-282, 1997
- 2) S Shan, H Tanaka, Y Shoyama : Enzyme-linked immunosorbent assay for glycyrrhizin using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody and an eastern blotting technique for glucuronides of glycyrrhetic acid. *Anal Chem* 73 : 5784-5790, 2002
- 3) 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 : 1157-1160, 2001
- 4) N Fukuda, H Tanaka, Y Shoyama : Isolation of the pharmacologically active saponin ginsenoside Rb1 from ginseng by immunoaffinity column chromatography. *J Nat Prod* 63 : 283-285, 2000

プロフィール

正山 征洋 (しょうやま・ゆきひろ)



● 現職

長崎国際大学薬学部・物質薬学分野・薬品資源学 教授
九州大学特任教授
九州大学名誉教授

● 略歴

昭和 43 年 九州大学薬学部助手
昭和 50～51 年 マサチューセッツゼネラルホスピタル博士研究員 (脳内スフィンゴリピッドの代謝研究)
昭和 53 年 九州大学薬学部助教授
平成 3 年 同上教授
平成 16～18 年 九州大学大学院薬学研究院長・薬学府長・薬学部長
平成 19 年 同退職

平成 19 年 長崎国際大学薬学部教授，九州大学特任教授，九州大学名誉教授

●受賞

平成 11 年度 宮田学術賞

平成 20 年度 日本生薬学会賞