

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 免疫化学的測定法を基盤とした生薬及び漢方製剤の品質評価法の開発及び標準化に関する研究

(英語) Development of quantitative analysis for quality control and standardization of crude drugs and Kampo formula based on immunoassays

研究開発実施期間: 令和3年7月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 坂元 政一

(英語) SEIICHI SAKAMOTO

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 九州大学大学院薬学研究院・准教授

(英語) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University・Associate Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

近年、天然資源を原料とした医薬品、食料品及び化粧品需要が増加傾向にある。中でも、天然物医薬品の原料である生薬の利用の増加は著しく、第十八改正第一追補日本薬局方（局方）には、生薬や生薬製剤が 289 品目、漢方処方エキス製剤が 39 品目収載されている。

生薬は、化学医薬品を中心とした西洋薬と異なり数百～数千の多成分から構成されており、これらの組成や含有量は種々の要因により大きく変動する。そのため、局方収載における確認試験や定量法には、生薬毎に特徴的な指標成分が設定されている。また、指標成分が有効成分である場合も多く、その含有量が医薬品自体の薬効に大きく影響する。そのため、**指標成分に着目した生薬及び漢方製剤の品質評価法の確立や、実測を通じた品質評価や標準化は、医薬品の有効性や安全性を担保するうえで必要不可欠である。**

現在、局方の生薬及び漢方処方エキスの指標成分の定量法には、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)や定量核磁気共鳴スペクトル測定法(qNMR)が利用されている。両者は、多成分系の生薬から微量指標成分を検出するために多くの前処理を要する。また、qNMR は高額機器を要するうえ、成分間のシグナル重複による測定妨害が懸念される。これらの欠点は、いずれも「生薬の多成分系」に由来するため、多成分から微量成分を特異的且つ高感度に検出する方法の確立が問題解決の糸口になる。そこで、本研究では、**指標成分に対する特異的なモノクローナル抗体(mAb)を酵素標識免疫吸着測定法(ELISA)及び蛍光標識免疫吸着測定法(FLISA)に適用することで、従来法を凌駕する生薬・漢方製剤の新規品質評価法を確立し、それらの品質評価及び標準化を行うことを目的とした。**

局方では、生薬は 1 つの指標成分が、漢方処方エキスは約 3 つの指標成分が設定されている。本研究では、5 種類の指標成分に対する特異的な mAb を作製し、既存の 3 種類の特異的な mAb と合わせて免疫化学的測定法に应用することで、生薬及び漢方製剤の品質評価法を確立し、標準化することを目的とした。

具体的には、先ず、上記 5 種類の指標成分[サイコサポニン b2 (SSb2; 柴胡)、バイカリン (BC; 黄芩)、ペオニフロリン (PF; 芍薬)、ゲニポシド(GP; 山梔子)及びヘスペリジン(HP; 陳皮)]に特異的な mAb を作製し、ELISA に应用することで、生薬の品質評価法を確立することを計画した。その後、それらと既存のグリチルリチン酸(GC; 甘草)、ジンセノシド Rb₁(GRb₁; 人參)及びセンノシド A(SA; 大黃)にそれぞれ特異的な mAb を蛍光発光波長の異なる蛍光プローブでそれぞれ標識し、FLISA に应用することで、多成分同時分析可能な漢方処方エキスの品質評価法を確立することを計画した。上記全 8 種類の mAb の組み合わせにより局方収載漢方処方エキス 39 品目中 16 品目の品質評価法確立が可能となる。

これらの免疫化学的測定法を用いて 5 種類中 3 種類の生薬、16 品目中 3 品目の漢方処方エキスをモデルとした品質評価及び標準化を達成することを目指した。

先ず、5 種類に対する mAb を作製するため、それぞれの化合物に対する免疫原を調製後、マウスに対し免疫感作を行った。その結果、SSb2、GP 及び HP の免疫原を免疫したマウスの血清を用いた ELISA により血中抗体価及び各化合物に対する特異的な反応性が認められた。そこで、それらのマウスの脾臓より脾細胞を調整し、脾細胞とマウスミエローマ細胞(SP2/0)をポリエチレングリコールを用いて融合し、ハイブリドーマを作製した。その後、SSb2、GP 及び HP に対してそれぞれ特異的な特徴を示す抗体を産生するハイブリドーマ株を幾度にも及ぶクローニングとスクリーニングにより選抜し、それぞれ、SSb2-mAb、GP-mAb 及び HP-mAb を得ることに成功した。続いて、調製した SSb2-mAb、GP-mAb 及び HP-mAb を用いた ELISA により柴胡、山梔子及び陳皮などの生薬及びそれらを含む漢方処方エキスの品質評価法の確立を行った。各種 ELISA のバリデーション試験は、日米 EU 三極薬品承認審査ハーモナイゼーション国際会議(ICH)の「分析法バリデーションに関するテキスト」の真度 (HPLC、LC-MS との比較)、精度 (ウェル間 (intra-アッセイ)及びプレート間 (inter-アッセイ)の誤差判定)、特異性 (添加回収率試験)、検出限界(LOD, IC₁₀)及び直線性等を参考に評価した。

各種バリデーション試験の結果、それぞれの mAb を用いた ELISA において柴胡の SSb2 は、1.95–125 ng/ml (LOD: 2.13 ng/ml)[Ochi et al., J. Nat. Med., 78(2024)160]、山梔子の GP は、0.391–12.5 µg/ml (LOD: 0.314 µg/ml)[Noguchi et al., Fitoterapia, 174(2024)105829]、陳皮の HP は、1.56–25.0 ng/ml (LOD: 1.12 ng/ml)[Noguchi et al., Phytochem. Anal., 34(2023)652]の濃度範囲内でそれぞれの生薬・漢方製剤の定量が可能であり、確立した ELISA がそれぞれの品質評価法として高い真度、精度及び特異性を示すことが明らかとなった。

続いて、既存の抗体及び新たに作製した抗体を用いて多成分同時分析可能な漢方処方エキスの品質評価法の確立を目指した。まず、GC 及び SA の 2 種類を指標成分とする大黃甘草湯の品質評価法の確立を行った。GC-mAb 及び SA-mAb をそれぞれ蛍光波長の異なる量子ドット(QDs)の QDs705 及び QDs625 で標識することで、QDs705-labeled GC-mAb 及び QDs625-labeled SA-mAb を調製した。次に、それぞれ 1 成分系(QDs705-labeled GC-mAb 又は QDs625-labeled SA-mAb)、2 成分系(QDs705-labeled GC-mAb 及び QDs625-labeled SA-mAb)の FLISA へ展開することで GC 及び SA の同時定量系の構築を目指した。その結果、GC は、0.0977–3.13 µg/ml (LOD: 0.105 µg/ml)、SA は、0.391–12.5 µg/ml (LOD: 0.525 µg/ml)の濃度範囲内で 2 成分同時定量が可能であることが判明した。また、GC と GRb₁ の 2 種類を指標とする麦門冬湯についても品質評価法の確立を検討した。GC-mAb 及び GRb₁-mAb を上記同様に QDs705 及び QDs625 で標識し、QDs705-labeled GC-mAb 及び QDs625-labeled GRb₁-mAb を調製した。次に、それぞれ 1 成分系(QDs705-labeled GC-mAb 又は QDs625-labeled GRb₁-mAb)、2 成分系(QDs705-labeled GC-mAb 及び QDs625-labeled GRb₁-mAb)の FLISA へ展開することで GC 及び GRb₁ の同時定量系の構築を目指した。その結果、GC は、0.0977–3.13 µg/ml (LOD: 0.0888 µg/ml)、GRb₁ は、0.391–3.13 µg/ml (LOD: 0.561 µg/ml)の濃度範囲内で 2 成分同時定量が可能であることが判明した。

次に、更なる多成分系の FLISA への展開を目指し、GC、HP 及び GRb₁ の 3 種類を指標成分等する六君子湯の品質評価法の確立を行った。GC-mAb、HP-mAb 及び GRb₁-mAb をそれぞれ蛍光波長の異なる QDs625、QDs705 及び QDs800 で標識し、それぞれ QDs625-labeled GC-mAb、QDs705-labeled HP-mAb 及び QDs800-labeled GRb₁-mAb を調製した。続いて、1 成分系、3 成分系の FLISA へと展開することで GC、HP 及び GRb₁ の同時定量系の構築を目指した。その結果、GC は、0.0391–2.50 µg/ml (LOD: 0.0242 µg/ml)、HP は、1.95–125 ng/ml (LOD: 1.66 ng/ml)、GRb₁ は、0.0781–2.50 µg/ml (LOD: 0.0851 µg/ml)の濃度範囲内で 3 成分同時定量が可能であることが判明した。

一方、上記 FLISA を品質評価法への適応を目指し、バリデーション試験を実施した結果、真度、精度及び特異性において品質評価法への適応が難しいと思われる結果が得られた。使用した個々の mAb の対象化合物に対する高い特異性は確認されているため、これらの原因が QDs を標識した mAb (QDs-mAb)の非特異的な吸着に由来するものであると思われる。そこで、非特異的な吸着を防ぐため、ブロッキング溶液、QDs の標識方法、QDs 標識 mAb の希釈溶液・倍率等、種々の条件の最適化を行った。その結果、QDs と各種 mAb の結合試薬の濃度及び反応時間を変更することで目指す FLISA に使用可能な安定で対象化合物に特異的な QDs 標識 mAb を得ることに成功した。

上述のように当該研究課題研究期間内に新たに調製した mAb を用いた ELISA により 5 種類中 3 種類の生薬の、16 品目中 3 品目の漢方処方エキスをモデルとした品質評価法の確立及び標準化を達成することを目的とした。研究計画に基づき、当該課題を実施した結果、ELISA により柴胡、山梔子及び陳皮及びそれらを含む漢方製剤の品質評価法を確立することに成功した。一方、多成分同時分析可能な FLISA による漢方処方エキスの品質評価については、2 成分及び 3 成分が同時分析可能な FLISA の系の構築に成功したものの、QDs-mAb の非特異的な吸着がバリデーション試験に影響を及ぼすことが示唆された。そのため、問題解決に時間を要することになり、現在までに漢方処方エキスの品質評価法の確立に至っていない。

局方は日本の医薬品の公的な品質規範書である。**本研究は、局方収載の生薬・漢方製剤に着目した品質評価法の確立及び標準化であり、保健医療上重要な医薬品の有効性及び安全性の確保、ひいては日本国民の保健・**

医療・福祉の向上に繋がる可能性を秘めており、公益性の高い研究課題である。

また、使用する mAb は、物理的に安定且つ均一なものを大量調製できる。加えて、ELISA は誰もが行える簡便な測定法である。そのため、確立した測定法のキット化は実現性が高く社会への実装が強く期待されるものであり、品質確保が求められる天然物医薬品の開発・製造・管理における波及効果は極めて大きい。一方、**FLISA は、煩雑な前処理が不要なうえ、1 枚のプレートで複数の指標成分の同時定量が可能であり、漢方製剤の品質評価及び標準化に大きく貢献する。**そのため、今後も継続して FLISA による漢方処方エキスの品質評価法の確立を目指す。

Recently, the use of crude drugs as raw materials for natural medicines has increased remarkably, and the 18th revision of Japanese Pharmacopoeia (JP) lists 289 crude drugs, and 39 Kampo formula. Crude drugs are composed of a lot of components, and their composition and content vary greatly depending on various factors. For this reason, the confirmation tests and quantification methods in the JP is performed on the basis of marker compound of each crude drug. Therefore, it is essential to develop the method for quality control for crude drugs and Kampo formula based on marker compound. In JP, one marker compound and about three marker compounds are set for quality control of crude drugs and Kampo formula, respectively. Nowadays, high-performance liquid chromatography (HPLC) and quantitative NMR are used for quantitative analysis of marker compound of crude drugs and Kampo formula. Both methods require pretreatment to detect trace amount of marker compound from a lot of components in the crude drugs. In addition, qNMR requires expensive equipment, and interference due to signal overlap between components are considered as concerns. Since all of these drawbacks are derived from the “multi-component system of crude drugs”, development of specific and sensitive method to detect trace amount of marker compound from multi-component system can be solution of these problem. Therefore, the purpose of this study is to develop specific and sensitive quantitative analysis for crude drugs and Kampo formula by applying specific monoclonal antibodies (mAbs) against marker compound to enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and fluorescence-linked immunosorbent assay (FLISA), and to evaluate and standardize the quality of these natural medicines.

In this study, we focused on five marker compounds, saikosaponin b2 (SSb2), baicalin (BC), paeoniflorin (PF), geniposide (GP) and hesperidin (HP) that can be used for quality control of Bupleurum Root, Scutellaria Root, Peony Root, Gardenia Fruit, and Citrus Unshiu Peel, respectively, and planned to produce specific mAb against individual marker compound to be applied to ELISA. Then, we planned to develop quantitative analysis by labeling mAbs with fluorescent probes of different emission wavelengths and applying them to FLISA, which would enable simultaneous analysis of multi-components. Considering the combination of mAbs against these five marker compounds with three mAbs that specifically recognize glycyrrhizin (GC), ginsenoside Rb₁ (GRb₁), and sennoside A (SA) that have already produced, 14 of 35 Kampo formula can be evaluated by FLISA. Using these immunochemical assays, we aimed to achieve quality evaluation and standardization of 3 out of 5 crude drugs and 3 out of 16 Kampo formula.

Primarily, we prepared antigen for five compounds, and immunized into abdominal cavity of mice to produce mAb. As a result, ELISA using serum from mice immunized with SSb2, GP, and HP showed increases in antibody titer, and specific reactivity to each compound. Therefore, splenocytes were prepared from the spleens of those mice, and hybridomas were generated by fusion of splenocytes with mouse myeloma cells (SP2/0) using polyethylene glycol. Subsequently, hybridoma cell lines producing specific antibodies against SSb2, GP, and HP were selected by repeated cloning and screening to obtain SSb2-mAb, GP-mAb, and HP-mAb, respectively. Next, quality evaluation methods for crude drugs such as Bupleurum Root, Gardenia Fruit, and Citrus Unshiu Peel were established by ELISA using the SSb2-mAb, GP-mAb, and HP-mAb produced. Various validation analyses were performed on the basis of International Conference on Harmonization (ICH) regulatory guidelines. As a result, all of ELISAs developed using above-mentioned mAb exhibited good accuracy, precision, and specificity sufficient for the quality evaluation methods of Bupleurum Root, Gardenia Fruit, and Citrus Unshiu Peel.

Subsequently, we aimed to establish a quality evaluation method for Kampo formula that enables simultaneous analysis of multiple components using existing and newly produced mAbs. First, we established a method for quality evaluation of Daiokanzoto based on GC and SA as two marker compounds, and prepared Quantum dots (QDs)-labeled mAb using QDs705 and QDs625 for GC-mAb and SA-mAb, respectively. Next, we aimed to establish a simultaneous GC and SA quantification system by developing a one-component or two-component FLISA system. As a result, it was found

that simultaneous determination of two components was possible because standard curve for GC and SA was successfully obtained. In the same way, we have also established a quality evaluation method for Bakumondoto based on GC and GRb₁ by using QDs-labeled mAb using QDs705 and QDs625 for GC-mAb and GRb₁-mAb, respectively. Next, we established a method to evaluate the quality of Rikkunshito based on GC, HP, and GRb₁ as three marker compounds, aiming to further expand the method to multi-component FLISA, and prepared QDs-labeled mAb using QDs625, QDs705, and QDs800 for GC-mAb, HP-mAb and GRb₁-mAb, respectively. Subsequently, we aimed to establish a simultaneous quantitative system for GC, HP, and GRb₁ by expanding to one-component and three-component FLISA. As a result, the simultaneous determination of the three components was found to be possible as standard curve for GC, HP, and GRb₁ and SA was successfully obtained. However, subsequent various validation analysis revealed that to apply these multi-component FLISA system to Kampo formula was difficult in terms of their accuracy, precision, and specificity. Since the high specificity of the individual mAbs used for these FLISA was confirmed by ELISA developed, these results were obtained due to the non-specific adsorption of the QDs-labeled mAb. Therefore, we optimized various conditions, and, finally succeeded in obtaining a QDs-labeled mAb that is stable and specific to the target compound by changing the concentration and reaction time for the binding reagent between QDs and mAbs.

In this study, we could develop quality assessment methods for three crude drugs, Bupleurum Root, Gardenia Fruit, and Citrus Unshiu Peel. However, the quality assessment methods for Kampo formula has not been developed in time because it took time to solve the problem raised up during validation analysis, although we succeeded in establishing a FLISA system capable of simultaneous analysis of two and three components.

The JP is the official quality standard for pharmaceutical products in Japan. This research is a research project of high public interest because it has the potential to establish and standardize a quality evaluation method focusing on crude drugs and Kampo formula listed in the JP, and to ensure the efficacy and safety of drugs important for healthcare, which improve the health, medical care, and welfare for Japanese. Therefore, we will continue to establish a quality evaluation method for Kampo formula by multi-component FLISA system.