

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究)
総括研究報告書

プエラリア・ミリフィカ含有健康食品の安全性評価法の確立

研究代表者 坂元 政一 九州大学薬学研究院薬学研究院生薬学分野 准教授

研究要旨

マメ科のプエラリア・ミリフィカはタイ全土に分布する植物であり、強力な植物エストロゲン(PEs)を産生する。しかし、近年、その貯蔵根を原材料とした健康食品が美容効果を謳い文句に日本国内の女性に浸透しており、それらの摂取により女性特有の生理作用に対する健康被害が報告されている。そこで、その原因物質として挙げられる PEs のミロエストロール(ME)、デオキシミロエストロール(DME)及びクワクリン(KWA)に関し、磁気イムノアッセイ (MPs-EIA)とバイオインプリンティング法の二つの手法を用いてプエラリア・ミリフィカ含有健康食品の安全性評価法を確立することを本研究の最終目標としており、本年度は、ME、DME 及び KWA の精製およびそれら化合物に対する MPs-EIA の系の確立を目指した研究に取り組んだ。

KWA に対する MPs-EIA の確立では、抗 KWA モノクローナル抗体 (mAb 11 F) が、KWA と磁気ビーズ(MPs)とのコンジュゲート(KWA-MPs)に上手く反応し、KWA の定量可能性が示唆された。そのため、各種パラメーターの最適化を検討した結果、2.44-78.1 ng/mL の濃度範囲内で高感度に KWA が定量できることが示唆された。

ME に対する MPs-EIA の確立では、調製した ME と MPs とのコンジュゲート (ME-MPs)が抗 ME モノクローナル抗体(mAb 1H1)と非特異的に吸着することが判明した。このことは高いバックグラウンドを生み出し、遊離の ME の存在下においてもその存在を分かりにくくする。そこで、バックグラウンドの軽減のため、ME-MPs の調製方法や ME-MPs 調製時の ME の濃度を検討したものの大幅な改善は認められなかった。抗体との非特異的な吸着の少ない ME-MPs の調製が本法の鍵となる。そのため、異なる MPs の使用やそれを用いたため非特異的吸着を抑制する方法を模索する。

DME に関しては、その不安定な物性及び ME との高い構造類似性により本課題に要求される高純度の DME をほとんど得ることが出来なかった。

研究分担者 藤井 俊輔 長崎国際大学
健康管理学部・講師

A. 研究目的

マメ科のプエラリア・ミリフィカはタイ全土に分布する植物であり、強力な植物エストロゲン(PEs)を産生することから、タイ国内では古くから閉経期の「若返り」を求めて使用されている。しかし、近年、その貯蔵根を原材料とした健康食品が美容効果を謳い文句に日本国内の女性に浸透しており、それらの摂取により女性特有の生理作用に対する健康被害が報告されている。その原因物質として、PEsのミロエストロール(ME)、デオキシミロエストロール(DME)及びクワクリン(KWA)が挙げられる(Fig. 1)。特に、MEやDMEは、女性ホルモン様作用が大豆イソフラボンの数百倍～数千倍強い(1)。そのため、PEsの迅速且つ簡便な検出法の確立が健康被害の未然防止策と成り得る。

近年、申請者らはME、DME及びKWAをそれぞれ認識するモノクローナル抗体を調製し、ELISAや免疫クロマトグラフィーに応用した(2-6)。しかし、それでも分析時間には改善の余地がある。そこで、本研究では磁気イムノアッセイ(Fig. 2, MPs-EIA)とバイオインプリンティング法の二つの手法を用いて分析時間の改善を図り、従来法を凌駕するプエラリア・ミリフィカ含有健康食品の安全性評価法を確立する。

今年度は、上記三種類のPEsを定量可能なMPs-EIAの確立を目指した。磁気ビーズを用いたMPs-EIAは生体分子を分離する手法として幅広く利用されている。

MPsを用いることでインキュベーション時間を短縮し、分離・洗浄を効率化することができるため、様々なターゲット分子に対する高感度且つ迅速な測定法の開発がなされてきた(7-9)。多くの場合、ターゲット分子に対する抗体をMPsに修飾し、無標識のターゲット分子と酵素標識したものを用いた間接競合法により検出を行う。つまり、抗体をMPsに修飾する過程と抗原に酵素を標識する過程が必要になるが、これは抗体-抗原間の親和性を下げ、感度と特異性を減少させる原因となりうる。この問題を解決するため、近年、ターゲット分子で直接修飾されたMPsに基づく免疫測定法を開発した(10)。これにより、非効率的な酵素標識の過程を省略することでき、従来法と比較し、分析時間の短縮が可能となった。更に、MPs-EIAは、対象化合物と磁気ビーズ(MPs)のコンジュゲートを用いて、溶液中に拡散させた状態で抗原-抗体反応が進行する。そのため、MPsの優れた懸濁性と大きな表面積によりELISAと比較し大幅な分析時間の短縮が期待できる。

本法の確立により迅速性の優れたPEsの品質評価法を確立する。

B. 研究方法

1. PEsの精製

先ず、本研究を遂行する上で必要不可欠なPEsの精製を用いて行った。材料のプエラリア・ミリフィカのエタノールエキスはタイ王国コンケン大学のWaraporn Putalun教授の研究室で調製され、精製はシリカゲル(Silica gel 60, ナカライテスク, Kyoto, Japan)やオタクデシル基結合シリカ

ゲル (ODS、Cosmosil 75C18-OPN, ナカラ イテスク, Kyoto, Japan) を用いたカラムクロマトグラフィーにより行った。

2. PEs-MPs の作製

PEs と MPs (Dynabeads® M-270 Amine) のコンジュゲートは、カルボニルジイミダゾール(CDI)を用いた方法またはマンニッヒ反応により行った。

CDI を用いた方法では、PEs を CDI と共に DMF で溶解後、遮光、室温で 3 時間攪拌することで PEs を活性化させた。次に、MPs (50 μ L : 1.5 mg 相当) を 1.5 mL シリコナイズチューブに分注しに懸濁した。磁気スタンド (Dynamag™-Spin, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて分離・洗浄後、PBS に懸濁させ、反応後の PEs 溶液 を加えて室温で 24 時間緩やかに攪拌した。その後、精製水による磁気分離・洗浄を行い、1% BSA 溶液を加えて室温で 4 時間緩やかに攪拌した。その後、PBS による磁気分離・洗浄を行い、終濃度 10 μ g/mL となるように PBS で懸濁し、4°Cにて保存した。

マンニッヒ反応を用いた方法では、PEs とホルムアルデヒド溶液(37%)を混和後、MPs (1.5 mg 相当を)添加し、24 時間攪拌した。この際、PEs の添加量で MPs への結合数を制御した。その後、上記同様 1%BSA 溶液でブロッキングを行い、その後、PBS による磁気分離・洗浄を行い、終濃度 10 μ g/mL となるように PBS で懸濁し、4°Cにて保存した。

PEs-MPs の成否は MPs-EIA より得られた吸光度から判断した。

3. MPs-EIA

3.1. 競合的 MPs-EIA

イムノプレート (F96 Maxisorp Nunc-immuno plate, Thermo fisher scientific Nunc A/S, Roskilde, Denmark)に PBS で懸濁した PEs-MPs (50 μ g/mL) を 100 μ L/well、競合物質及び一次抗体を各々 50 μ L/well ずつこの順に分注し、37°Cで 30 分間インキュベートした。磁気プレート上にプレートを 3 分間静置し、溶液をピペットにて取り除き、TPBS を 200 μ L/well ずつ分注した。これを 3 回繰り返す、溶液を取り除いた (以下、「磁気分離・洗浄」) 後、TPBS で 5000 倍希釈した POD 標識抗マウス IgG ヤギ抗体溶液を二次抗体として 100 μ L/well ずつ分注し、30 分間インキュベートした。磁気分離・洗浄後、基質溶液の TMB 溶液を 100 μ L/well ずつ分注し、15 分間インキュベート後、1 M の硫酸を 100 μ L/well ずつ分注した。その後、磁気プレート上にプレートを 1 分間静置し、上清を 150 μ L/well ずつ別のイムノプレートに移した。プレートリーダー (Multiscan™ FC Microplate Photometer, Thermo fisher scientific, Waltham, MA, USA)でこの溶液の 450 nm における吸光度を測定した。

3.2. 非競合的 MPs-EIA

競合的 MPs-EIA と同様に PBS で懸濁した Kwa-MPs を 100 μ L/well ずつ分注後、一次抗体のみを 100 μ L/well ずつ分注した。以下は競合的 MPs-EIA と同様である。

4. KWA に対する MPs-EIA の最適化

4.1. KWA-MPs の濃度検討

PBS で 0.05 µg/mL, 0.5 µg/mL, 5 µg/mL, 50 µg/mL に希釈した KWA-MPs 溶液を 100 µL/well ずつ分注し、一次抗体に抗 KWA モノクローナル抗体 (mAb 11 F, 10 µg/mL) 溶液を用いた非競合的 MPs-EIA で検討した。

4.2. mAb 11F の最適濃度検討

KWA-MPs 溶液 (50 µg/mL) を 100 µL/well ずつ分注し、一次抗体に TPBS で段階希釈した mAb 11F を用いた非競合的 MPs-EIA で検討した。

4.3. 一次抗体と二次抗体反応時間の検討

KWA-MPs 溶液 (50 µg/mL) を 100 µL/well ずつ分注し、一次抗体の反応時間が 5、10、15、30、60 分間となるように mAb 11F 溶液 (3.0 µg/mL) を加え、37°C でインキュベートした。磁気分離・洗浄後、二次抗体として TPBS で 5000 倍希釈した POD 標識抗マウス IgG ヤギ抗体溶液を 100 µL/well ずつ分注し、37°C で 15 分間インキュベートした。これ以降は主要操作に示した非競合的 MPs-EIA と同様の操作を行った。二次抗体の反応時間のみを 30、45 分間と変化させて同様の操作を行うことにより検討した。

4.4. ブロッキングが与える影響の評価

プレート を 2 枚用意し、うち片方は 5% スキムミルク含有 PBS をブロッキング液として 300 µL/well ずつ分注し、37°C で 1 時間インキュベートした。このプレートを TPBS にて洗浄し、ブロッキングを行ったプレート及び行っていないプレート、それぞれについて KWA-MPs 溶液 (50

µg/mL) を 100 µL/well ずつ分注し、競合物質に 5%メタノールで段階希釈した KWA 溶液、一次抗体に mAb 11F (3.0 µg/mL) を用いた競合的 MPs-EIA で評価した。

C. 研究結果

得られたエタノールエキス(1369 g)を用いて各種クロマトグラフィーを行った結果、プエラリア・ミリフィカの根皮(~20 kg)より高純度の ME (~28 mg)及び Kwa (~35 mg)の単離精製に成功した。しかしながら DME に関しては、その不安定性及び ME と極性の類似性から高純度なものを得ることはできなかった。そのため、KWA と ME を用いて MPs-EIA の確立に取り組んだ。

KWA 及び ME と MPs (Dynabeads® M-270 Amine)のコンジュゲートは、CDI を用いた方法またはマンニッヒ反応により行った。KWA にマンニッヒ反応を用いて KWA-MPs を調製した場合、非競合的 MPs-EIA において吸光度の上昇が認められなかった。そこで、抗 KWA モノクローナル抗体(mAb 11 F)の作製で用いた抗原の調製方法である CDI を用いて KWA-MPs の調製を行った。非競合的 MPs-EIA を行った結果、KWA と MPs の結合を意味する吸光度の上昇が KWA-MPs の濃度依存的に認められた(Fig. 3)。更に、遊離の KWA を用いて競合的 MPs-EIA を行った結果、阻害活性が認められたことから、この KWA-MPs が MPs-EIA へ応用できることが示唆された。続いて、ME と MPs とのコンジュゲート (ME-MPs)の調製を上記方法に従い 2 通り

で行った。マンニッヒ反応を用いて調製した ME-MPs では、微弱ながらも吸光度の上昇が認められた。しかしながら、遊離の ME を用いた場合、その競合活性は最大でも 41.6%で、更に、MEs-EIA の濃度が高いほどバックグラウンドが高く出ることが判明した(Fig. 4)。この傾向は、CDI を用いて ME-MPs を用いた場合でも変わらず、更に、ME の濃度の変更や異なるブロッキング溶液を用いても MPs-EIA 改善されなかった。

次に、競合活性の得られた KWA-MPs を用いた MPs-EIA の最適化を行った。

まず、MPs-EIA に用いる KWA-MPs の至適濃度を検討した。KWA-MPs は 50 $\mu\text{g/mL}$ から順次 10 倍希釈したものを用い、一次抗体として過剰量の mAb 11F (10 $\mu\text{g/mL}$) を用いた非競合的 MPs-EIA にて評価した(Fig. 3)。KWA-MPs の濃度に依存して吸光度の上昇が認められたものの、5 $\mu\text{g/mL}$ 以下では十分な発色が認められなかったため、KWA-MPs の至適濃度は 50 $\mu\text{g/mL}$ と決定した。

次に、MPs-EIA の一次抗体として用いる mAb 11F の至適濃度の検討を行った。ELISA では吸光度が 0.2–0.8 の範囲内で測定誤差が小さく信頼性の高い定量が可能になる。今回の MPs-EIA の測定原理は、間接競合 ELISA と同様に競合法であるため、競合物質が存在しない状況において一次抗体として mAb 11F を 40 $\mu\text{g/mL}$ から順次 2 倍希釈したものを用い、MPs-EIA にて吸光度が 0.8 付近になる条件を検討した (Fig. 5)。その結果、mAb 11F が 3.0 $\mu\text{g/mL}$ の時に 0.8 程度の吸光度が得られたため、これを最適濃度と決定した。

続いて、決定した濃度条件における、各種抗体 (一次抗体及び二次抗体) の最適な反応時間を検討した。一次抗体の反応時間を 5、10、15、30、60 分間、二次抗体の反応時間を 15、30、45 分間と変化させ非競合的 MPs-EIA を行い (Fig. 6)、吸光度が 0.8 以上となる最短の総反応時間を算出した (Fig. 7)。非競合的 MPs-EIA の結果、吸光度が 0.8 を超える反応時間は、一次抗体 30 分間・二次抗体 30 分間のとき、一次抗体 30 分間・二次抗体 45 分間のとき、二次抗体の反応時間に依らず一次抗体 60 分間のときであった。この中で総反応時間が最も短くなるのは両抗体がともに 30 分間 (合計 60 分間) のときであった。従って、この反応時間を最適条件として決定した。

ELISA では固相化抗原をプレートに吸着させた後、タンパク質の非特異的結合を防ぐことを目的としてスキムミルク等を用いたブロッキングを行うことが不可欠である。そして、このブロッキングの過程には通常 1–2 時間を要する。そこで、MPs-EIA においてブロッキングの有無が測定結果に与える影響を KWA を用いた競合的 MPs-EIA の結果に基づく KWA の検量域及び 50%阻害濃度 (IC_{50}) にて評価した (Fig. 8)。その結果、ブロッキングを行わなかった場合においても行った場合と同様に競合物質濃度に依存的な阻害曲線が得られ、一致した検量域 (2.44–78.1 ng/mL) と類似性の高い検量線が得られた。更に、両者の IC_{50} を比較した結果、ブロッキングを行った場合 (IC_{50} : 16.2 ng/mL) と行わなかった場合 (IC_{50} : 16.9 ng/mL) に顕著な差が認められなかった。

このことから、ブロッキングの有無が測定に与える影響は無視できるものであり、本 MPs-EIA では迅速な KWA 検出のためブロッキングを省略可能であることが示唆された。この結果は、MPs-EIA を用いた苦味配糖体のアマロゲンチンの検出においても認められており、MPs-EIA では化合物に依らず迅速な検出系が確立できることが示唆された(10)。

最適化した条件で、様々な濃度の KWA を競合物質に用いた競合的 MPs-EIA を行い、検量線を作成した (Fig. 9)。その結果、KWA の濃度が 2.44–78.1 ng/mL の範囲で吸光度との間に良好な直線性が得られ、この範囲で KWA の定量が可能であることが判明した。また、 IC_{10} により KWA の検出限界 (LOD) を算出したところ、1.90 ng/mL であった。これまでに確立した mAb 11F を用いた間接競合 ELISA の LOD が 1.13 ng/mL であることから両者の感度に大きな差は見られないことが判明した(2)。

D. 考察

KWA に関しては、MPs-EIA を用いた系の確立ができ、その信頼性や正確性を精査後、植物サンプルや健康食品サンプルを用いての定量を残すのみである。しかしながら、ME と DME に関しては課題が見つかった。

ME に関しては、プエラリア・ミリフィカの根皮より各種クロマトグラフィーにより高濃度かつ十分量を得ることができた。そのため、KWA 同様に MPs-EIA の系の確立に取り組んだ。本研究で用いた ME に対する特異的なモノクローナル抗

体(mAb 1H1)は、ME をカチオン化された牛血清アルブミン(c-BSA)にマンニッヒ反応で結合した物を免疫原として調製されたものである(6)。そのため、MPs も同様のマンニッヒ反応で ME と結合させ ME-MPs を調製すれば、MPs-EIA の系が確立できると予想していた。しかし、実際にマンニッヒ反応で調製した ME-MPs では、予想以上にバックグラウンドが高く、相対的に ME に対する阻害率が弱い現象が認められた。また、KWA と同様の CDI を用いた反応を試みた場合や ME-MPs の調製時の ME の濃度や、表面をブロッキングするタンパク質の種類 (BSA、ゼラチン、スキムミルク、カゼイン等)を検討しても大きな改善見られなかった。これらの検討より mAb 1H1 の MPs に対する非特異的な吸着がその原因となっている事が判明した。現在 MPs にはこれまでに成功例の多い Invitrogen の Dynabeads M-270Amine (Carlsbad, CA, USA)を用いている。MPs への非特異的な吸着は磁気ビーズ担体が大きく影響する事が予想される。そのため、異なる磁気ビーズを用いて mAb 1H1 の非特異的な吸着の低い担体の探索を行い、その最適化、系の確立を目指す必要がある。

一方、DME に関しては、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等を駆使し、精製を試みたものの ME との極性が近く、更に不安定性も相まって高純度なものを単離するには至っていない。安定性の考慮した精製条件の検討及び分取用 HPLC を用いた精製条件の検討が必要である。

E. 結論

KWA、ME 及び DME はマメ科クズ属植物プエラリア・ミリフィカ特有の成分であり、古くからタイやミャンマーで美容・健康を保つための薬として使用されてきた。また、プエラリア・ミリフィカにはこうしたエストロゲン作用の他にも、抗骨粗鬆症作用や抗腫瘍作用等の薬効を有することも明らかになっており、非常に興味深い薬用植物である。近年では更年期障害の改善や、美肌効果を目的としたサプリメントにプエラリア・ミリフィカが使用されており、こうした製品は今日の日本でも簡単に入手することが可能である。しかしながら、サプリメント中の不均一な分量から生じる健康被害や、基原植物の信憑性が疑われる製品が問題視されている。特にプエラリア・ミリフィカ含有健康食品による健康関連相談は2015年以降に集中しており、2017年4月までに寄せられた209件のうち200件近くが2015年以降に報告されていることから、プエラリア・ミリフィカ特有成分であるKWA、ME 及び DME の検出はこれらの問題解決に繋がる重要な課題である。

これまでこれらの定量分析法として HPLC や間接競合 ELISA などの手法が開発されてきたが、コスト面や分析時間、操作の煩雑さ等、何かしらの問題を抱えていた。これを解決する手法として、本研究では MPs を用いた免疫学的測定法「MPs-EIA」の開発に取り組んだ。MPs は優れた懸濁性と大きな表面積といった性質を有するため、短時間での PEs の測定が期待できる。

KWA に関しては MPs-EIA の系の確立が成功し、最適化した条件では 2.44–78.1 ng/mL の範囲で高感度に KWA の定量が可能であることが判明した。更に、LOD は 1.90 ng/mL と ELISA の感度 (検量域: 1.53–48.8 ng/mL, LOD: 1.13 ng/mL) と比較しても大きな差は見られなかった。また、総反応時間は従来の間接競合 ELISA が 260 分間であるのに対し、MPs-EIA では 75 分間と 1/3 以下であることが示された。MPs-EIA は様々な植物二次代謝産物の定量に応用できる高い汎用性を備えている。そのため、今回洗い出された種々の問題を解決し、ME や DME に対する MPs-EIA の確立を目指す。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

I. 参考文献

- 1) Matsumura A, Ghosh A, Pope GS, Darbre PD. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **94**(5): 431-443 (2005).
- 2) Yusakul G, Togita R, Minami K, Chanpokaiboon K, Juengwatanatrakul T, Putalun W, Tanaka H, Sakamoto S, Morimoto S. *Fitoterapia*, **133**: 23-28 (2019).
- 3) Krittanai S, Kitisripanya T, Udomsin O, Tanaka H, Sakamoto S, Juengwatanatrakul T, Putalun W. *Biomed Chromatogr*, **32**: e4330

(2018).

4) Yusakul G, Kitisripanya T, Juengwatanatrakul T, Sakamoto S, Tanaka H, Putalun W. *J Nat Med*, **71**: 641-650 (2018).

5) Kitisripanya T, Inyai C, Komaikul J, Krittanai S, Juengwatanatrakul T, Sakamoto S, Tanaka H, Morimoto S, Putalun W. *J Nat Med*, **71**: 659-664 (2017).

6) Kitisripanya T, Krittanai S, Udomsin O, Juthasit K, Komaikul J, Juengwatanatrakul T, Sakamoto S, Tanaka H, Morimoto S, Putalun W. *Planta Med*, **83**(10): 855-861 (2017).

7) Haukanes BI and Kvam C. *Bio/Technology*, **11**: 60-63 (1993).

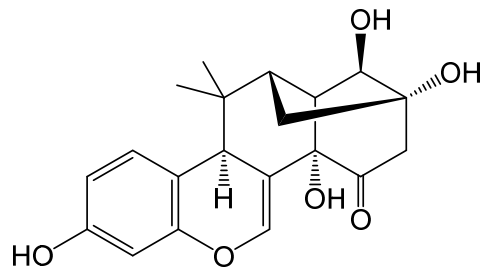
8) Stejskalová E, Horáková P, Vacek J, Bowater RP, Fojta M. *Anal Bioanal Chem*, **406**: 4129-4136 (2014).

9) Sun Y, Li Y, Meng X, Meng X, Qiao B, Si Z, Hu P, Lu S, Ren H, Liu Z, Zhang Y, Meng L, Zhou Y. *Sens. Actuators B Chem*, **252**: 633-640 (2017).

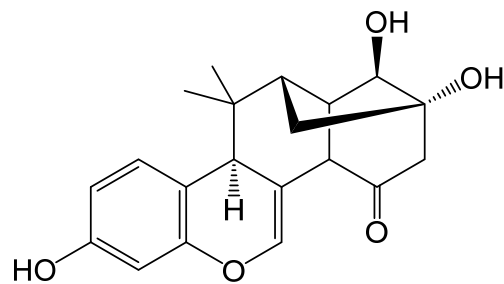
10) Sakamoto S, Wada S, Morita Y, Yamaguchi T, Tanaka H, Morimoto S. *Talanta*, **194**:731-736 (2019).

Figure 1

(A)



(B)



(C)

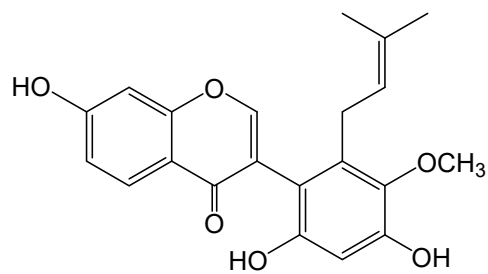


Fig. 1 ミロエストロール[ME, (A)]、デオキシミロエストロール[DME, (B)]及びクワクリン[KWA, (C)]の構造

Figure 2

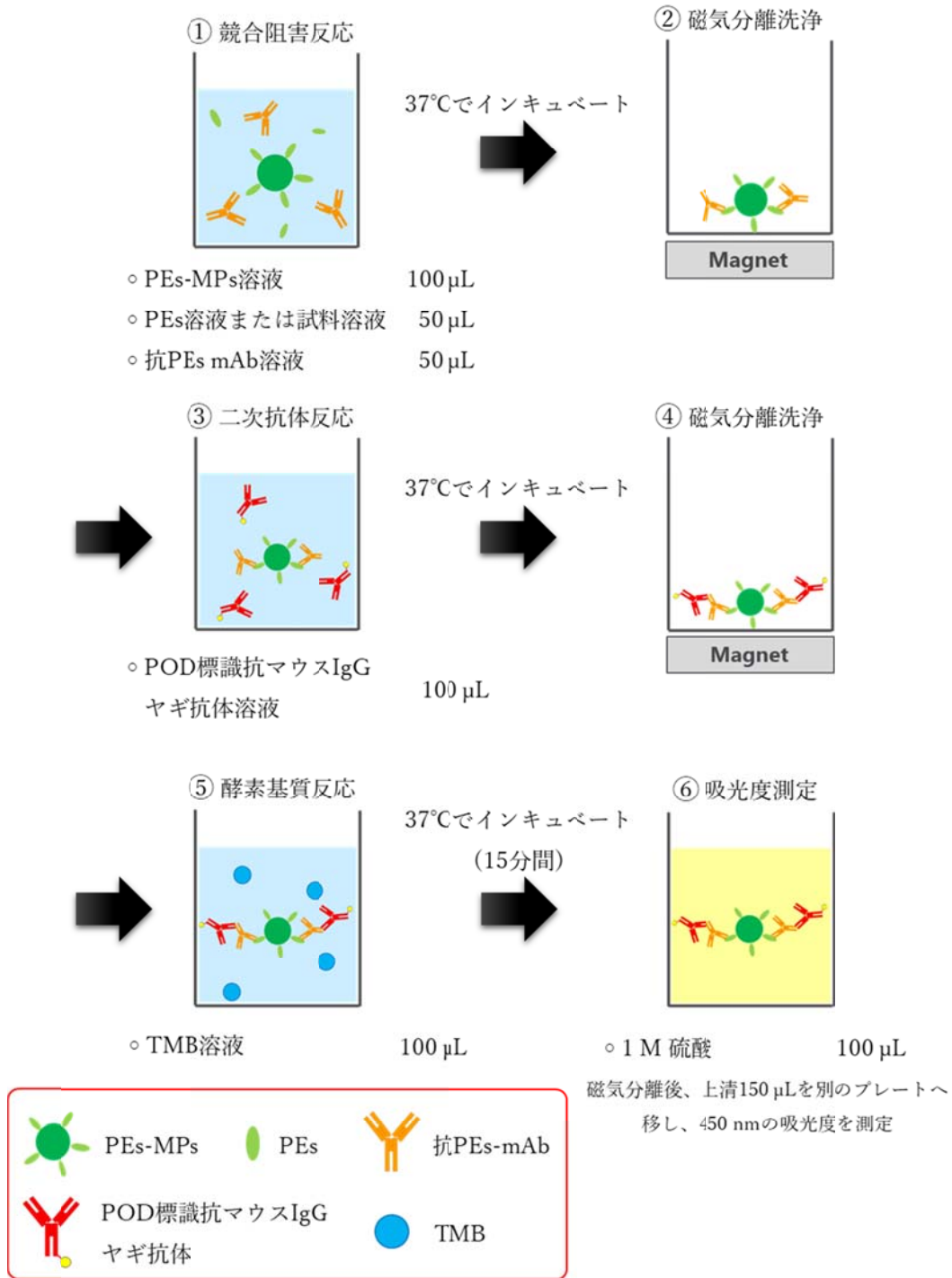


Fig. 2 競合的 MPs-EIA の概略図

Figure 3

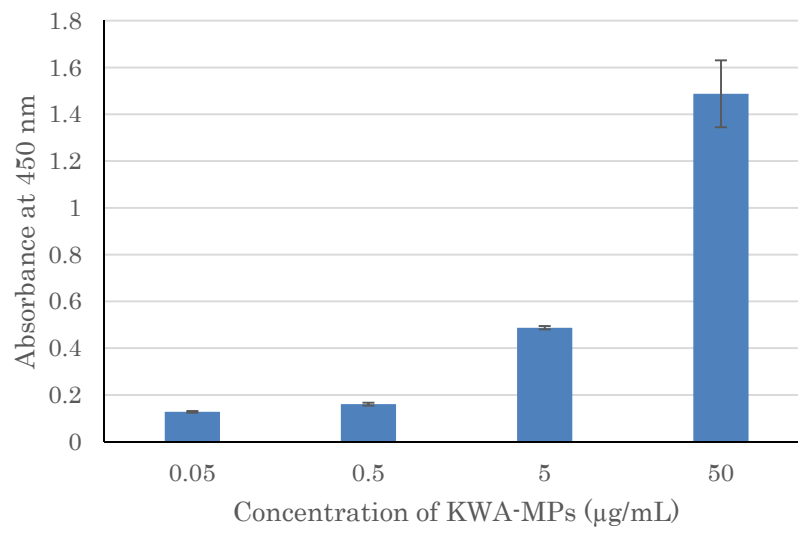


Fig. 3 非競合的 MPs-EIA における KWA-MPs の濃度依存性

Figure 4

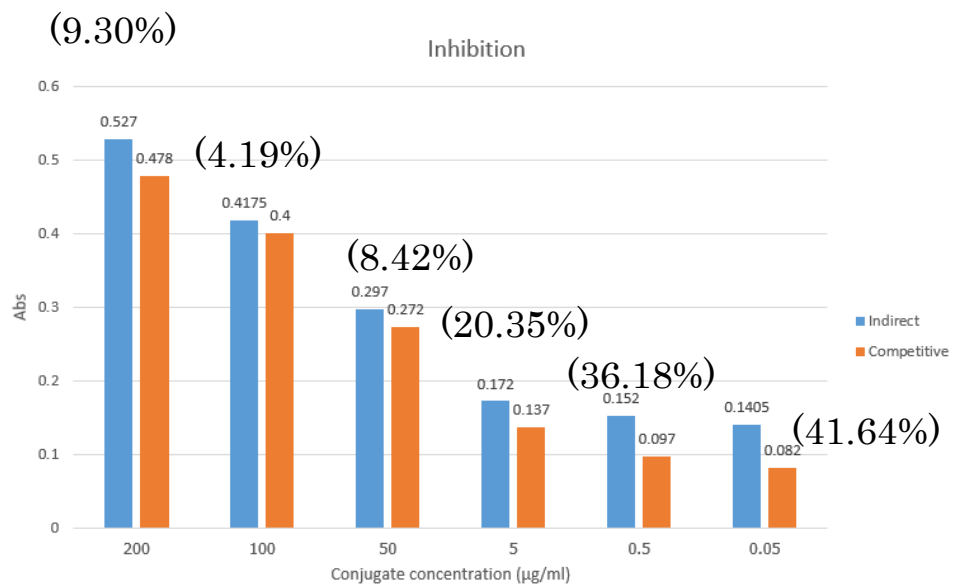


Fig. 4 非競合的 MP-EIA(青)及び競合的 MP-EIA(オレンジ)における ME-MPs の濃度依存性

Figure 5

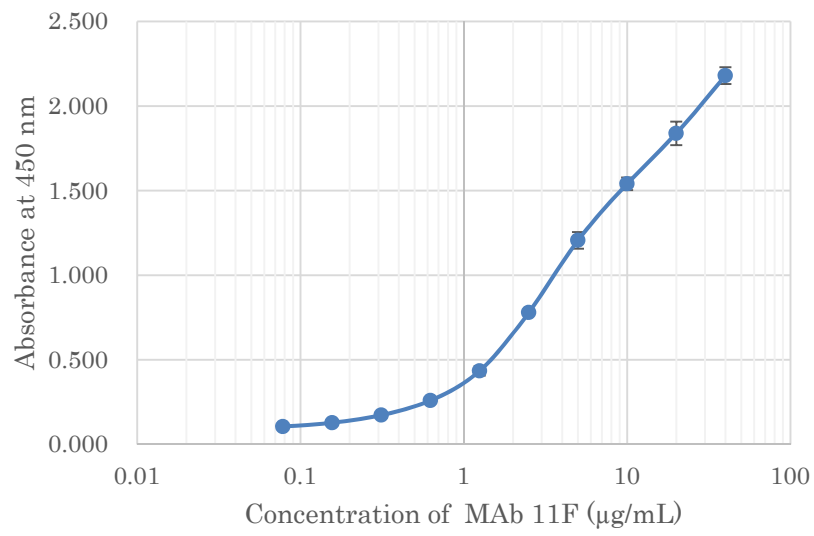


Fig. 5 非競合的 MP-EIA を用いた mAb 11F の最適濃度の検討

Figure 6

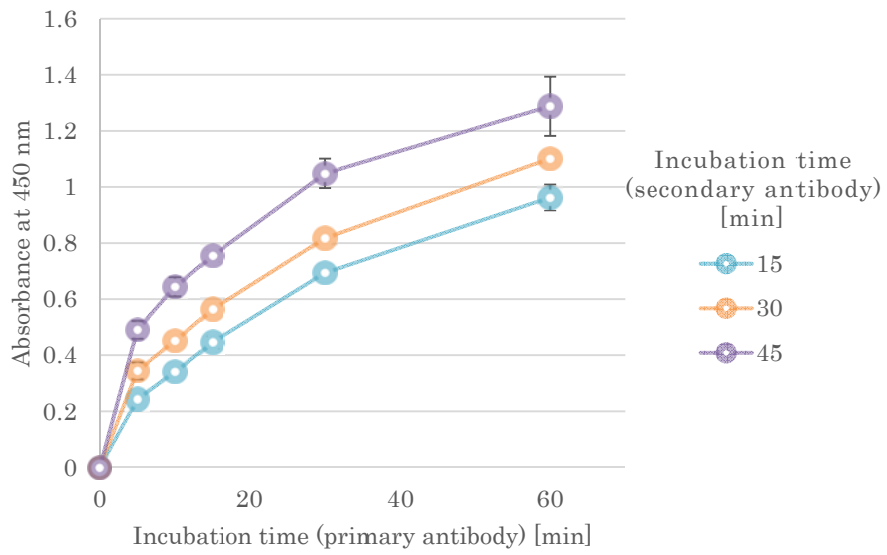


Fig. 6 一次抗体及び二次抗体の反応時間とその吸光度

Figure 7

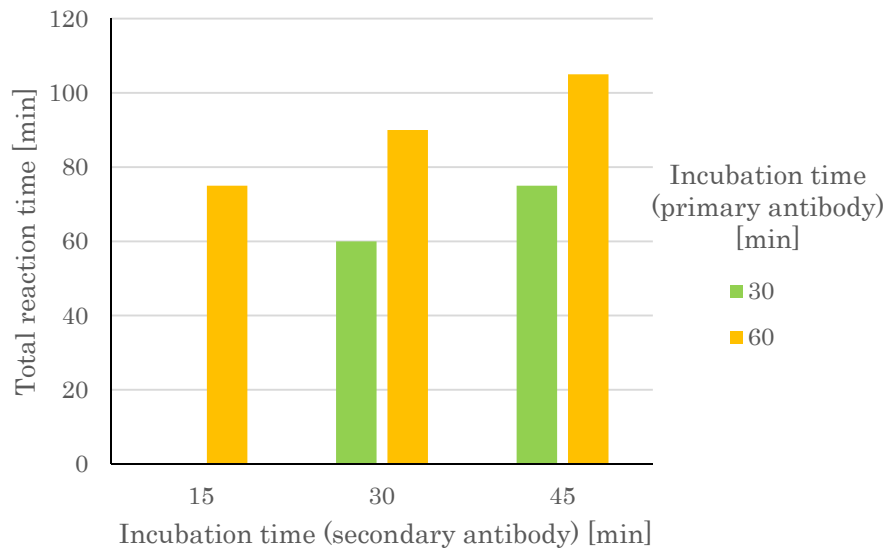


Fig. 7 吸光度が 0.8 以上の条件における総反応時間

Figure 8

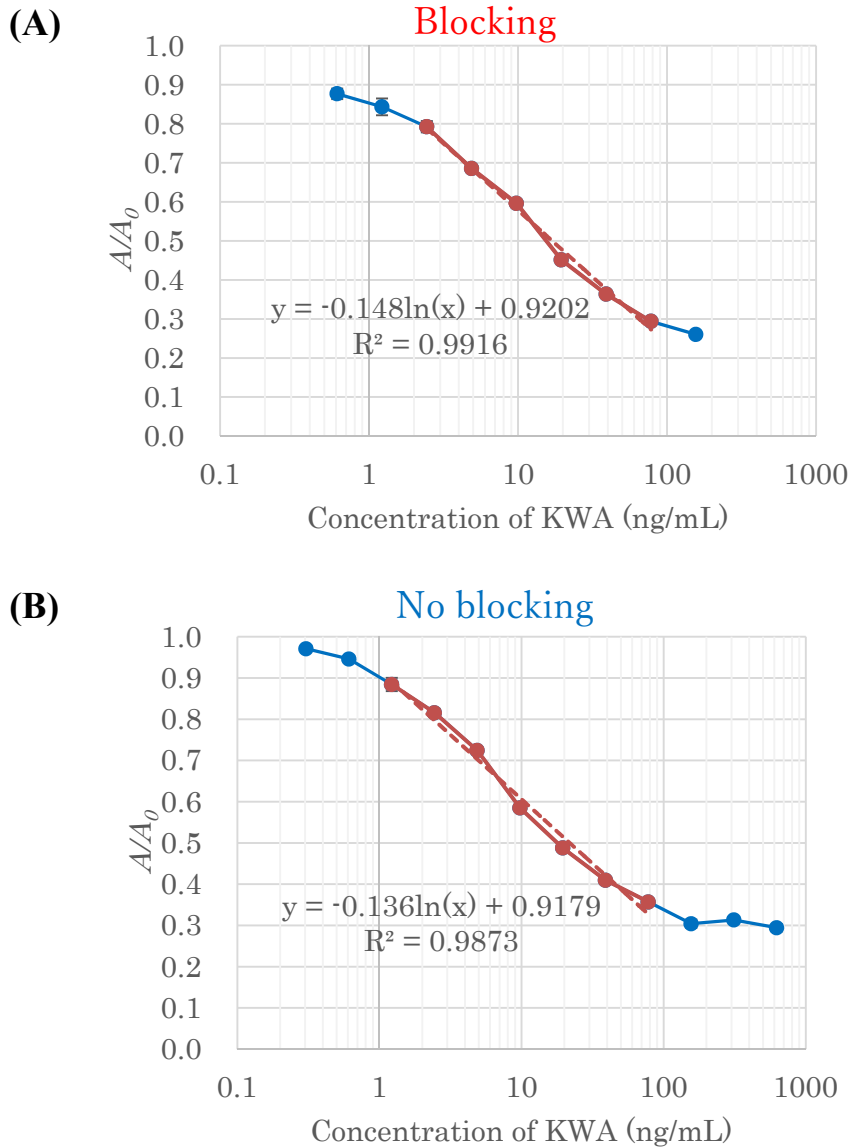


Fig. 8 ブロッキングが競合的 MPs-EIA に与える影響の検討

(A)はブロッキング有りを、(B)はブロッキング無しのグラフである。

また、A は 450 nm での吸光度 (競合物質有り)を、 A_0 は 450 nm での吸光度 (競合物質無し)を示している。

Figure 9

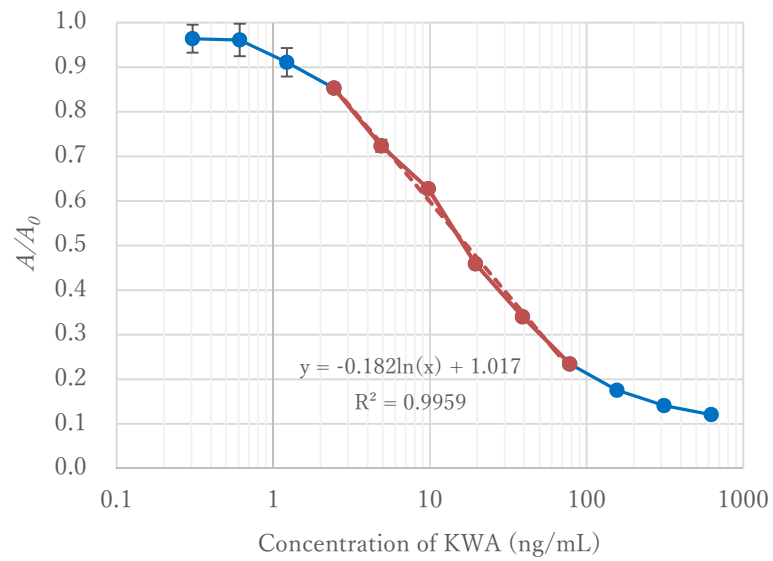


Fig. 9 最適化した競合的 MPs-EIA における KWA の検量線

A は 450 nm での吸光度 (競合物質有り)を、A₀は 450 nm での吸光度 (競合物質無し)を示している。