

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究)

総合研究報告書

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、磁気ビーズイムノアッセイ (MPs-EIA)とバイオインプリンティング(BI)を用いた検出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目標としている。

まず、本研究に必要な不可欠な非売品の PEs (KWA、ME 及び DME)の調製を各種カラムクロマトグラフィーにより行った。その結果、高純度の KWA (~35 mg)と ME (~28 mg)の精製に成功した。しかし、高純度な DME は~2 mg しか得ることが出来なかった。そのため、ME と KWA に対して MPs-EIA と BI を用いた検出法を確立することにした。

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に起因する高いバックグラウンドの抑制に向けた研究に取り組んだ。しかし、mAb 1H1 の MPs に対する非特異的吸着を抑制することはできなかった。原因として他の抗体(mAb)では認められないため、mAb 1H1 の物性に問題解決の糸口があることが予想された。一方、KWA に対する MPs-EIA の確立では、KWA の定量系を確立し、健康食品及びプエラリア・ミリフィカに含有する KWA の定量分析を行った。種々の確認試験より、確立した MPs-EIA は高感度且つ高選択性に加えて、正確性及び信頼性を併せ持つことが裏付けられた。

ME の検出を目的とした BI を用いた検出法においては、遊離の ME に対して約 50%の競合阻害が認められ、現在も ME の検出系の確立を目指している。一方、KWA に関しては、系の確立からサンプルを用いた KWA の実測まで完結し、プエラリア・ミリフィカ含有健康食品の安全性評価へ適応可能な手法を確立した。

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

プエラリア・ミリフィカはタイ全土に広く生育するマメ科の植物であり、強力な植物エストロゲン(PEs)を含有することから、タイ国内では古来より閉経後の「若返り」を求めて使用されている(1)。近年、プエラリア・ミリフィカの貯蔵根を含む健康食品やサプリメントが美容効果(美肌、バストアップ、ダイエットなど)を謳い文句として販売されており、日本国内の若い女性を中心に浸透している。しかし、それらの摂取による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。これらの引き起こす原因物質としてミロエストロール(ME)、デオキシミロエストロール(DME)及びクワクリン(KWA)(Fig. 1)などの PEs が挙げられているが、これまでに品質(成分)管理に適応可能な PEs の検出法はほとんどない。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法を用いた PEs の検出方法が報告されているものの HPLC 法では ME と DME の分離が困難な上、試料の煩雑な前処理を要する。また、HPLC 法を用いた KWA の検出では、溶出に約 30 分も要する(2)。このような背景より、我々はこれら PEs を認識するモノクローナル抗体(mAb)を作製し、試料溶液の前処理が不要な酵素標識免疫吸着測定法(ELISA)や免疫クロマトグラフィーへ応用した(3-7)。しかし、それでも ELISA は分析時間に長時間を要し、免疫クロマトグラフィーは多検体同時分析に不向きであることから改善の余地がある。そこで、本研究

では磁気ビーズイムノアッセイ (MPs-EIA)とバイオインプリンティング(BI)を用いた検出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ことを目的としている。

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(8-10)。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(11)。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。MPs-EIA の概略図を以下に示す (Fig. 2)。まず、(i)PEs-MPs コンジュゲート、PEs に特異的な mAb、PEs を含む試料溶液を混

和し、(ii)PEs-MPs に結合した mAb の磁気分離・洗浄後、(iii)HRP 標識二次抗体を用いた反応させる。次に、(iv)磁気分離・洗浄後、(v)酵素-基質反応により PEs を競合法で検出する。

また、BI は、標的分子に対して特異的に相互作用する空間をテイラーメイドにバイオポリマーネットワーク内に構築する手法であり、近年、BI に関しては、カビ毒のアフラトキシン B1 を認識するオボアルブミン(OVA) (12)や deoxynivalenol と zearalenone を同時認識するウシ血清アルブミン (BSA) (13)などが報告されているものの、未だ報告例は極めて少ない。本項では、この技術を応用し PEs 認識能を持つタンパク質を創出し、これらの迅速な新規検出系に応用することを目的としている。そのタンパク質として西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)や報告例のある OVA を選択した。

HRP を用いた BI の概要を以下に示す (Fig. 3)。まず、(i)酸性条件下において、HRP の折り畳み構造を解く。次に、(ii)鑄型となる PEs 分子を加え、変性した HRP との分子間相互作用を促し、PEs 結合部位を有する立体配置を形成させる。そして、(iii)中和後、新たに形成された高次構造を安定化させるため二官能性試薬(グルタルアルデヒド等)を用いて HRP を架橋する。最後に、(iv)透析により鑄型 PEs 分子を取り除く。これら一連の流れにより PEs を取り囲むように HRP が架橋されるため、PEs を認識する PEs-biHRP が形成される。これを ELISA における一次抗体兼二次抗体として用いることで二次抗体を用いない競合的な迅速検出が可能となる。

このように、MPs-EIA と BI を用いた検出法により迅速性の優れた PEs の品質評価法を確立する。PEs の迅速な検出法の確立は、原材料のプエラリア・ミリフィカを扱う販売事業主の安全性管理への負担を軽減し、その使用拡大が健康被害の未然防止に繋がる可能性を秘めている。

## B. 研究方法

### 1. PEs の精製

まず、本研究を遂行する上で必要不可欠な PEs の精製を行った。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)、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)、Sephadex LH-20 (Cytiva, MA, USA)及び HPLC を用いた各種カラムクロマトグラフィーにより行った。

### 2. 植物及びサプリメント抽出物の調製

各植物及びサプリメントサンプルを 50 mg 精秤し、メタノール 1 mL を加え 30 分間超音波処理した。その後、遠心 (10000 rpm, 4°C, 10 分間) し、上清を採取した。これを 5 回繰り返し、溶媒を除去したものに、メタノール 1 mL を正確に加えて溶解させたものを抽出物とし、使用時まで -20°C で保存した。

### 3. MPs-EIA の確立

#### 3.1. PEs-MPs の作製

MPs には、表面にアミノ基が修飾され

ている異なる 4 種類の MPs [SiMAG-Amine beads (chemicell GmbH, Germany); SupraBead-Amine (Recenttec, Taipei); FG beads NH<sub>2</sub> beads (Tamagawa, Japan); Dynabeads M-270 Amine (Invitrogen, USA)] とカルボキシル基の修飾されている MPs [Dynabeads M-270 Carboxylic Acid (Invitrogen, USA)]を用いた。アミノ基が修飾された MPs では、カルボニルジイミダゾール(CDI)を介した方法とマンニッヒ反応を用いてコンジュゲートの調製を行い、カルボキシル基が修飾された MPs では、結合アミノ基増やしてから、マンニッヒ反応と CDI を介した方法を用いた方法を用いた

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  $\mu$ 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<sup>TM</sup>-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  $\mu$ g/mL となるように PBS で懸濁し、4 $^{\circ}$ 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  $\mu$ g/mL となるように PBS で懸濁し、4 $^{\circ}$ Cで保存した。

PEs-MPs の成否は MPs-EIA より得られた吸光度から判断した。

### 3.2. 間接競合 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  $\mu$ g/mL) を 100  $\mu$ L/well、競合物質及び一次抗体を各々 50  $\mu$ L/well ずつこの順に分注し、37 $^{\circ}$ 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  $\mu$ L/well ずつ分注した。これを 3 回繰り返し、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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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<sup>TM</sup> FC Microplate Photometer, Thermo fisher scientific, Waltham, MA, USA)でこの溶液の 450 nm における吸光度(OD<sub>450</sub>)を測定した。

### 3.3. 間接 MPs-EIA

間接競合 MPs-EIA と同様に PBS で懸濁した PEs-MPs を 100  $\mu$ L/well ずつ分注後、

一次抗体のみを 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  ずつ分注した。以下は競合的 MPs-EIA と同様である。

#### 4. BI を用いた検出法の確立

##### 4.1. BI 法

HRP もしくは OVA (1 mg) に DW (1 mL) を加え、室温で 1 分間攪拌して溶解させた。その後、HCl (0.1 M, 150  $\mu\text{L}$ ) を加えることで pH 3 に調整し、室温で 10 分間攪拌した。続いて、標的分子溶液 (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in 20% (v/v) MeOH, 100  $\mu\text{L}$ ) を加え、室温で 10 分間攪拌した。そして、NaOH (0.1 M, 200  $\mu\text{L}$ ) を加えることで pH 8 に調整した後、GA (1% (v/v), 100  $\mu\text{L}$ ) を加え、4°C で 30 分間攪拌した。4°C で一晩静置した後、透析を 4°C で 48 時間行い、PEs-biHRP 及び PEs-biOVA 溶液を得た。この時、標的分子溶液の代わりに 20% (v/v) MeOH を加えることで nonPEs-biPROs 溶液を得た。それぞれ使用時まで 4°C で保管した。

##### 4.2. KWA-HSA の作製

Kwa (2.5 mg) と CDI (3.4 mg) を sdDMF (250  $\mu\text{L}$ ) に溶解し、遮光、室温で 3 時間攪拌した。その後、HSA (4.8 mg) を 50 mM carbonate buffer (2 mL) に溶解した溶液に加え、室温で一晩攪拌した。そして、DW に対して透析を 4°C で 48 時間行った後、凍結乾燥により KWA-HSA (3.8 mg) を得た。使用時まで -20°C にて保存した。

##### 4.3. KWA-HRP の作製

KWA (1.9 mg) と CDI (2.2 mg) を sdDMF (200  $\mu\text{L}$ ) に溶解し、遮光、室温で 3 時間攪拌した。その後、HRP (4.0 mg) を 50 mM carbonate buffer (2.1 mL) に溶解し

た溶液に加え、室温で一晩攪拌した。そして、DW に対して透析を 4°C で 48 時間行った後、凍結乾燥により KWA-HRP (3.0 mg) を得た。使用時まで -20°C にて保存した。

##### 4.4. PEs-タンパク質コンジュゲートを固相化した間接競合 ELISA 様アッセイ 1 (Fig. 4)

50 mM carbonate buffer (pH 9.6) に溶解した PEs-タンパク質のコンジュゲート (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) をイムノプレートに 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  分注し、37°C で 1 時間インキュベートした。T-PBS で 3 回洗浄 (以下、「洗浄」) した後、各ブロッキング液を 300  $\mu\text{L}/\text{well}$  分注し、37°C で 1 時間インキュベートした。ブロッキングを行わない時はこの操作を省略した。続いて、競合物質の PEs (in 5% (v/v) MeOH) を 50  $\mu\text{L}/\text{well}$ 、一次抗体を 50  $\mu\text{L}/\text{well}$  分注し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、作製した PEs-biOVA 又は nonPEs-biOVA を T-PBS でそれぞれ希釈したものを 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  分注し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、T-PBS で 4000 倍希釈した一次抗体 (anti-OVA antibody [6C8]) を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  分注し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、T-PBS で 20000 倍希釈した二次抗体 (anti-mouse IgG1 goat antibody (HRP)) を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  分注し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、基質溶液 (TMB) を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  分注し、37°C で 20 分間インキュベートした。その後、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M) を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  分注し、プレートリーダーにより OD<sub>450</sub> を測定した。

#### 4.5. PEs-biOVA を固相化した競合 ELISA 様アッセイ 2 (Fig. 5)

50 mM carbonate buffer (pH 9.6) で希釈した各濃度の PEs-biOVA 又は nonPEs-biOVA をイムノプレートに 100  $\mu$ L/well 分注し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、BSA (1% (w/v) in PBS) を 300  $\mu$ L/well 分注し、37°C で 1 時間インキュベートし、ブロッキングを行った。ブロッキングを行わない時は、この操作を省略した。競合物質の PEs (in 5% (v/v) MeOH) を 50  $\mu$ L/well、標的分子-HRP を 50  $\mu$ L/well 分注し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、PBS で希釈した標的分子-HRP を 100  $\mu$ L/well 分注し、37°C で 1 時間インキュベートした。洗浄後、基質溶液 (TMB) を 100  $\mu$ L/well 分注し、37°C で 20 分間インキュベートした。その後、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M) を 100  $\mu$ L/well 分注し、プレートリーダーにより OD<sub>450</sub> を測定した。

#### C. 研究結果及び考察

各種クロマトグラフィー (シリカゲルクロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー及び HPLC) を駆使し、ペラリア・ミリフィカの根皮 (~20 kg) より PEs (KWA、ME 及び DME) の精製を試みた。その結果、高純度の KWA (~35 mg) と ME (~28 mg) の精製に成功した。しかし、高純度な DME は ~2 mg しか得ることが出来なかった。DME の収量は、MPs-EIA 及び BI を用いた検出法のいずれにおいても不十分な量であった。これは、DME と ME の構造類似性による極性の近さや DME の不安定性が単離を困難にした原因と推測される。DME は時

間の経過とともに分解し、ME に変換されることが報告されている。このことから、DME を得るためにはより多くの原材料を要することが判明した(14)。そのため、ME と KWA に対して MPs-EIA と BI を用いた検出法の確立を目指した。

MPs-EIA における磁気ビーズ(MPs)には、これまでに使用・成功実績のある Dynabeads M-270 Amine (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) を第一選択とした。MPs-EIA の確立では、先ず ME と MPs のコンジュゲート、ME-MPs コンジュゲートを調製することより始め、その成否は、抗 ME モノクローナル抗体(mAb 1H1) を用いた MPs-EIA により評価した。マンニッヒ反応及びカルボニルジイミダゾール(CDI) を用いて調製した ME-MPs コンジュゲートを用いた場合は、弱い競合阻害が確認されたものの、いずれもバックグラウンド値が高く、相対的に ME に対する阻害がマスクされた状態になっていた。これらの現象は、ME-MPs の調製方法、MPs 表面のブロッキング溶液の検討、及び mAb 1H1 の濃度の検討を行ったものの改善は見られなかった。このため、mAb 1H1 の MPs に対する非特異的な吸着がその原因になっていることが示唆された。そこで、次に、MPs (4 種類) 及び ME-MPs コンジュゲートの調製方法を検討し、非特異的吸着を抑制する方法を模索した。MPs には、表面にアミノ基が修飾されている異なる 3 種類の MPs [SiMAG-Amine beads (chemicell GmbH, Germany); SupraBead-Amine (Recenttec, Taipei); FG beads NH<sub>2</sub> beads (Tamagawa, Japan)] とカルボキシル基の修飾されている MPs

[Dynabeads M-270 Amine (Invitrogen, USA)]を用いた。アミノ基が修飾された MPs では、マンニッヒ反応と CDI を介した方法を用いてコンジュゲートの調製を行い、カルボキシル基が修飾された MPs では、結合アミノ基増やしてから、マンニッヒ反応と CDI を介した方法を用いた方法を用いたが、いずれの場合も mAb 1H1 の MPs に対する非特異的吸着を抑制することはできなかった。この現象は、他の抗体 (mAb) では認められないため、mAb 1H1 の物性に問題解決の糸口があることが予想される。そのため、新たな抗 ME mAb を作製することが解決への近道だと考える。

KWA の検出を目的とした MPs-EIA の確立では、抗 KWA モノクローナル抗体 (mAb 11F) が、KWA-MPs に上手く反応し、KWA の定量への応用可能性が示唆された。そのため、各種パラメーター (KWA-MPs の濃度、mAb 11F の濃度、ブロッキング操作の有無、一時抗体及び二次抗体の反応時間) の最適化を検討した。この結果、KWA-MPs と mAb 11F の濃度ではそれぞれ 50 µg/mL と 3 µg/mL が最適濃度であることが判明した。また、本系では、通常一時間を要するブロッキング操作が不要なうえ (Fig. 6)、一次抗体と二次抗体の反応時間が計 60 分で十分な吸光度が得られることが判明した (Fig. 7)。次に、最適条件下で間接競合 MPs-EIA を行った結果、KWA の検量域が 2.44–78.1 ng/mL であり、検出限界が 1.90 ng/mL と高感度であった (Fig. 8)。本系の信頼性を確認試験により検討した。その結果、Inter-、Intra-assay 試験における良好な最大変動係数 (10% 以下) 及び ELISA による定量値との高い相

関性が得られたことから本系の高い信頼性が示唆された (Table 1)。次に、本系の正確性を検討するため、添加回収試験を行った。その結果、92.4–115.5% の範囲で KWA を回収することができ、本系が植物抽出物中の夾雑物の影響を受けず、試料溶液中の KWA を正確に定量可能であることが示唆された (Table 2)。併せて、検討した最適条件において分析時間 (~75 分) が間接競合 ELISA (~260 分) の 1/3 以下であることから、従来法にかわる新たな迅速且つ簡便な分析手法として有用であることが示唆された (15)。

ME の検出を目的とした BI を用いた検出法の確立においては ME を鑄型分子として BI 法を行い、ME-biHRP 及び ME-biOVA を調製した。ME-biHRP は、アッセイ 1 (Fig. 4) の方法で、また、ME-biOVA は、ME-cBSA コンジュゲートを固相化したアッセイ 1 (Fig. 4) 及びアッセイ 2 (Fig. 5) の方法により ME に対する分子認識能を評価した。アッセイ 1 により活性を評価した結果、ME-biHRP には ME の認識能がないことが判明した。また、アッセイ 1 による ME-biOVA の ME 認識能の評価では、固相化する PEs-タンパク質コンジュゲートに ME-cBSA を用いたことによる ME-biOVA の cBSA に対する非特異的吸着が原因となり、競合阻害が見られなかった。しかしながら、アッセイ 2 による ME 認識能の評価では、遊離の ME に対して約 50% の競合阻害が認められた。そこで、ME の濃度を振って検量線の獲得を試みた結果、0.78–12.5 µg/mL の濃度範囲で ME の定量が可能であることが判明した (Fig. 9)。来年度を目途にこの系の確立、ME の実測

を目指している。

BI を用いた KWA 検出系の確立では、まず、KWA-biHRP を調製し、アッセイ 1 により KWA 認識能を評価した。その結果、KWA に対する認識能は認められず、KWA-biHRP をアッセイ 1 のプローブとして用いることができないことが判明した。一方、OVA を用いた KWA-biOVA では、KWA-HSA コンジュゲートを固相化したアッセイ 1 及びアッセイ 2 の両方で遊離の KWA に対する競合阻害が認められた。そこで、アッセイ 1 による KWA の定量分析法を開発した。まず、固相化コンジュゲートとして用いる KWA-HSA を CDI を介して調製した。続いて、固相化 KWA-HSA と KWA-biOVA を用いたアッセイ 1 の最適化を行い、KWA-biOVA の濃度は 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で、イムノプレートは 96 Well ELISA Microplate, PS, MICROLON®, F-Bottom; greiner bio-one (Kremsmünster, Germany) を使用し、ブロッキングを行わないことが最適な条件であることが判明した。そして、この条件下で固相化 KWA-HSA と KWA-biOVA を用いたアッセイ 1 を行い、KWA-biOVA 作製時の最適な透析液は 5% (v/v) Gly in PBS であり、4°C で 5 日間保存可能であること、更に、biOVA は DZE や GNE などのイソフラボン骨格を有する化合物に対する交差反応性を有することが確認された (Fig. 10)。KWA の濃度を振ってアッセイ 1 を行った結果、検量域は KWA 濃度 4.69–75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、LOD は 4.02  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であることが判明した (Fig. 11)。その検量域におけるウェル間及びプレート間の測定値の CV は最大でそれぞれ 7.4%、7.5% であることから、本系の高

い信頼性が確認された。また、これを用いてプエラリア・ミリフィカ抽出物中の KWA 定量を行い、8 サンプル中 7 サンプルにおいて定量可能であり、そのうち 6 サンプルにおいては、間接競合 ELISA で得られた値と比較して、その値が大きくなった (Table 3)。

続いて、固相化した KWA-biOVA と KWA-HRP を用いた競合 ELISA 様アッセイ 2 による KWA 定量分析法を開発した。まず、KWA-HRP を CDI を介して作製した。次に、固相化 KWA-biOVA と KWA-HRP を用いた競合 ELISA 様試験の最適化を行い、ブロッキングを BSA (1% (w/v) in PBS) で行い、biOVA 濃度が 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、KWA-HRP 濃度が 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の組み合わせが最適な条件であることが判明した。この条件下で固相化 KWA-biOVA と KWA-HRP を用いた競合 ELISA 様アッセイ 2 を行ったところ、その検量域は KWA 濃度 3.91–62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、LOD は 2.49  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であることが判明した (Fig. 12)。また、その検量域におけるウェル間及びプレート間の測定値の CV は最大でそれぞれ 8.7%、7.0% であり、本系の高い信頼性が認められた。更に、この定量系を用いてプエラリア・ミリフィカ抽出物中の Kwa 定量を行ったところ、8 サンプル中 6 サンプルにおいて定量ができ、そのうち 5 サンプルにおいて、その値が間接競合 ELISA で得られた値よりも大きくなった (Table 4)。

最後に、様々なタンパク質への BI による KWA 認識能の付与を行った。その結果、モノクローナル抗体である mAb 2H2 と mAb 1D2 にも KWA 認識能の付与を行えることが判明した。そこで、それぞれの

biPROs と KWA-HRP を用いた競合 ELISA 様アッセイ 2 の最適化を行ったところ、KWA-bimAb 2H2 と KWA-bimAb 1D2 の濃度が 225  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、KWA-HRP の濃度が 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の組み合わせが最適であることがわかった。続いて、最適化した条件の下 KWA-bimAb 2H2 と KWA-bimAb 1D2 並びに KWA-HRP を用いたアッセイ 2 による KWA 検量域の検討を行った結果、それぞれ KWA 濃度 2.34–37.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (LOD: 0.75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、2.34–75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (LOD: 0.65  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) であることが判明した (Fig. 13)。また、バイオインプリンティングが mAb の抗原認識能に及ぼす影響を検討したところ、KWA-bimAbs がバイオインプリンティングにより獲得した新たな分子認識能と引き換えに従来の抗原認識能を失うことが示唆された。

#### D. 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。

本研究では、分析時間の観点から従来法を凌駕する PEs (KWA、ME 及び DME) の品質評価法の確立を MPs-EIA と BI を用いた検出法により目指した。

先ず、PEs の調製を目指した。しかし、十分量の DME を得ることが出来なかった。そこで、ME と KWA に関して MPs-EIA と BI 法を用いた系の確立に取り組んだ。その結果、ME に関しては BI を用いた検出法で検量線を獲得することに成功し (Fig. 9)、KWA に関しては植物及びサプリメントサンプルの実測を含めた MPs-EIA と BI を用いた検出法の確立が完結した (15)。

現在も市場にはプエラリア・ミリフィカを原材料とした健康食品があふれており、健康被害を少しでも減らすためには PEs を指標とした安全性の評価が求められる。本研究における PEs の迅速な検出法の確立は、原材料のプエラリア・ミリフィカを扱う販売事業主の安全性管理への負担を軽減し、その使用拡大が健康被害の未然防止に繋がる可能性を秘めている。今回得られた研究成果がプエラリア・ミリフィカによる健康被害を減らす一助になればと考えている。

#### E. 健康危険情報

該当なし。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Sakamoto S, Eto R, Nuntawong P, Yusakul G, Juengwatanatrakul T, Putalun W, Fujii S, Tanaka H, Morimoto, S.

“Kwakhurin-magnetic particles conjugates enabled fast enzyme immunoassay for the detection of kwakhurin in *Pueraria candollei*”, *Phytochem. Anal.*, **31**(6): 930-936 (2020).

2) Phaisan S, Yusakul G, Nuntawong P, Sakamoto S, Putalun W, Morimoto S, Tanaka H.

“Immunochromatographic assay for the detection of kwakhurin and its application for identification of *Pueraria candollei* Wall. ex Benth. var. *mirifica* (Airy Shaw & Suvat.) Niyomdham” *Phytochem. Anal.*, in press (2021).

3) Juengsanguanpornasuk W, Yusakul G, Kitisripanya T, Krittanai S, Juengwatanatrakul T, Sakamoto S, Putalun W. “Quantification of methylisomiroestrol, a phytoestrogen of *Pueraria candollei*, by enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with a high-performance liquid chromatography” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **192**: 113674 (2021).

### 2. 学会発表

(国内学会)

1) 坂元 政一、衛藤 亮太、Poomraphie Nuntawong、Gorawit Yusakul、Waraporn Putalun、藤井 俊輔、田中 宏幸、森元 聡 “磁気ビーズイムノアッセイを用いた

プエラリア・ミリフィカに含有するクワクリンの定量分析法の確立” 日本薬学会第 141 年会、広島国際会議場、JMS アステールプラザ(広島)、2021 年 3 月 26-29 日、27P02-044

(国際学会)

2) Sakamoto S, Eto R, Nuntawong P, Yusakul G, Juengwatanatrakul T, Putalun W, Fujii S, Tanaka H, Morimoto S. “Development of magnetic particles-based enzyme immunoassay for the detection of kwakhurin in *Pueraria candollei*” 3rd International Conference on Traditional Medicine, Phytochemistry and Medicinal Plants (TMedPM-2020) (Online Meeting), November 2-4, 2020 (poster) E-poster 2

3) Minami K, Yusakul G, Fujii S, Sakamoto S, Morimoto S. “Bioimprinting technique for the quantitative analysis of kwakhurin” 3rd International Conference on Traditional Medicine, Phytochemistry and Medicinal Plants (TMedPM-2020) (Online Meeting), November 2-4, 2020 (poster) E-poster 4

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

## H. 参考文献

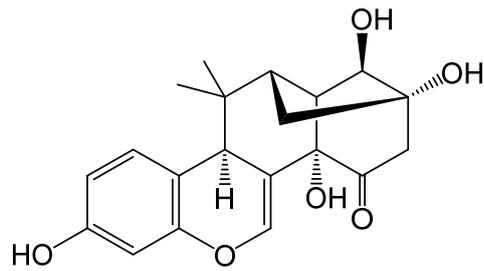
1) Matsumura A, Ghosh A, Pope GS, Darbre PD. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **94**(5): 431-443 (2005).

2) Shimokawa S, Kumamoto T, Ishikawa T, Takashi M, Higuchi Y, Chaichantipyuth C, Chansakaow S. *Nat Prod Res*, **27**(4-5): 371-

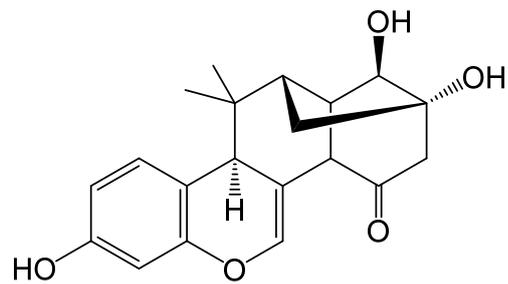
- 378 (2013).
- 3) Yusakul G, Togita R, Minami K, Chanpokaiboon K, Juengwatanatrakul T, Putalun W, Tanaka H, Sakamoto S, Morimoto S. *Fitoterapia*, **133**: 23-28 (2019).
  - 4) Krittanai S, Kitisripanya T, Udomsin O, Tanaka H, Sakamoto S, Juengwatanatrakul T, Putalun W. *Biomed Chromatogr*, **32**: e4330 (2018).
  - 5) Yusakul G, Kitisripanya T, Juengwatanatrakul T, Sakamoto S, Tanaka H, Putalun W. *J Nat Med*, **71**: 641-650 (2018).
  - 6) 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).
  - 7) 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).
  - 8) Haukanes BI and Kvam C. *Bio/Technology*, **11**: 60-63 (1993).
  - 9) Stejskalová E, Horáková P, Vacek J, Bowater RP, Fojta M. *Anal Bioanal Chem*, **406**: 4129-4136 (2014).
  - 10) 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).
  - 11) Sakamoto S, Wada S, Morita Y, Yamaguchi T, Tanaka H, Morimoto S. *Talanta*, **194**:731-736 (2019).
  - 12) Gutierrez RAV, Hedström A, Mattiasson B. *Biotechnol Rep*, **11**: 12-17 (2016).
  - 13) Beloglazova N, Lenain P, Tessier M, Goryacheva I, Hens Z, Saeger SD. *Talanta*, **192** :169-174 (2019).
  - 14) Udomsin O, Juengwatanatrakul T, Yusakul G, Putalun W. *J. Funct Foods*, **19**: 269-277 (2015).
  - 15) Sakamoto S, Eto R, Nuntawong P, Yusakul G, Juengwatanatrakul T, Putalun W, Fujii S, Tanaka H, Morimoto, S. *Phytochem. Anal*, **31**(6): 930-936 (2020).

**Figure 1**

**(A)**



**(B)**



**(C)**

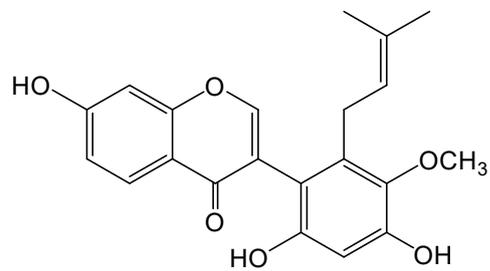


Fig. 1 ミロエストロール[ME, (A)]、デオキシミロエストロール[DME, (B)]及びクワクリン[KWA, (C)]の構造

Figure 2

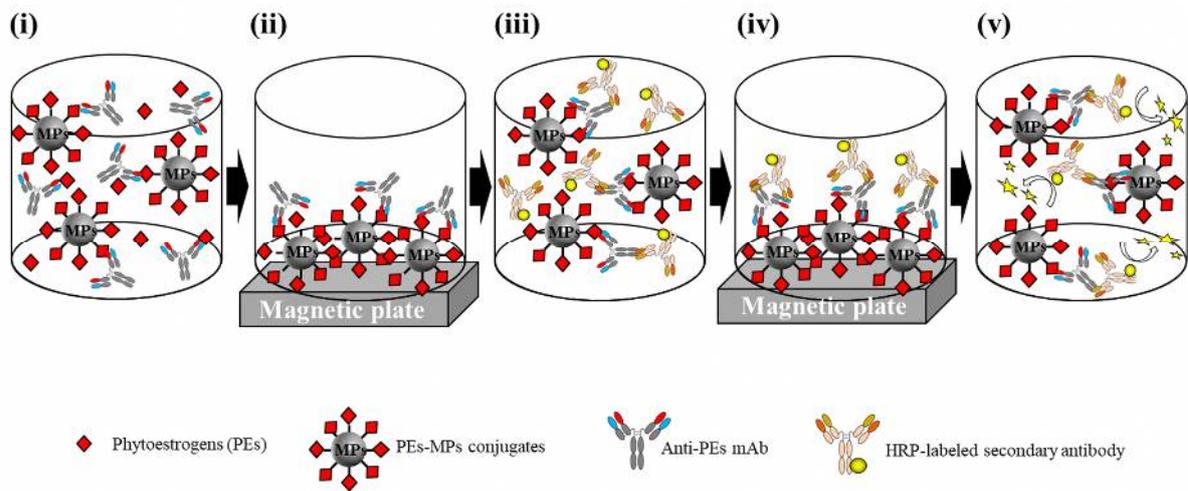


Fig. 2 間接競合 MPs-EIA の概略図

**Figure 3**

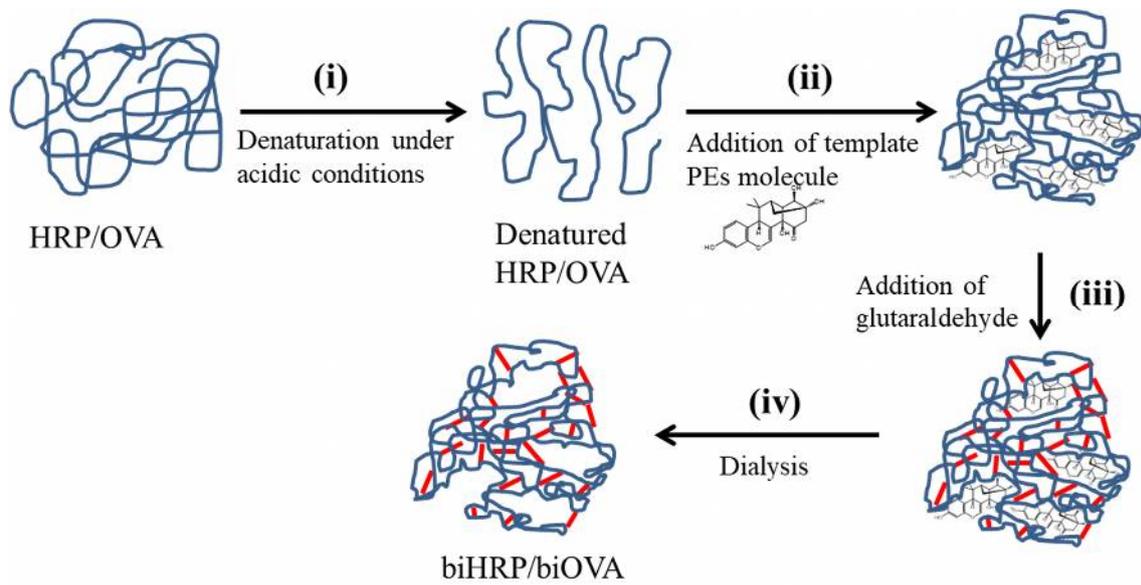


Fig. 3 BI法の概略図

Figure 4

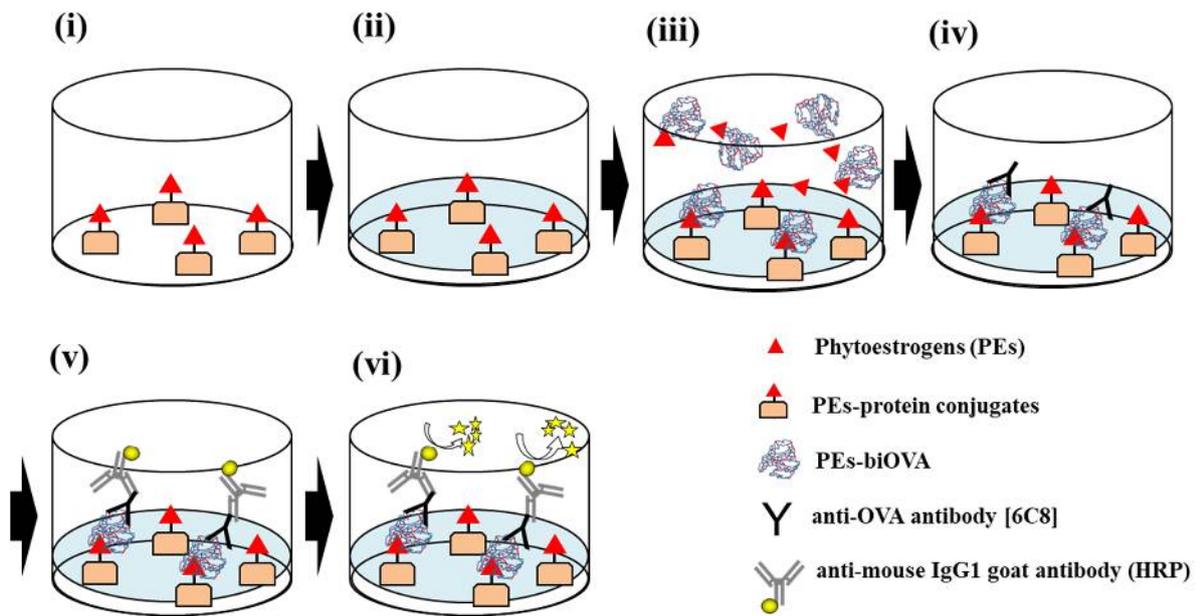


Fig. 4 PEs-タンパク質コンジュゲートを固相化した間接競合 ELISA 様アッセイ 1 の概略図

Figure 5

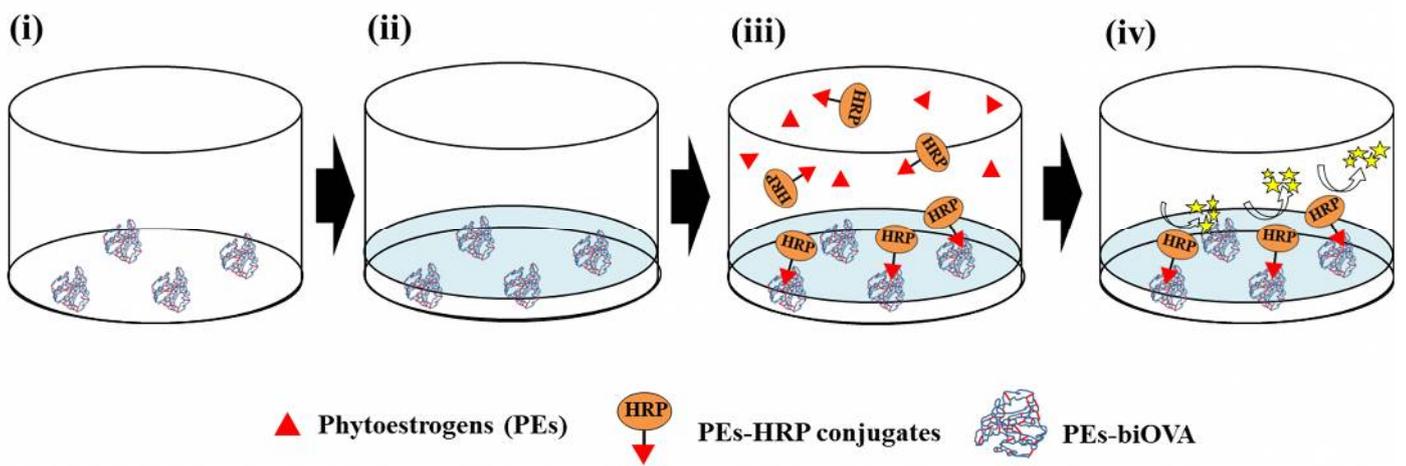
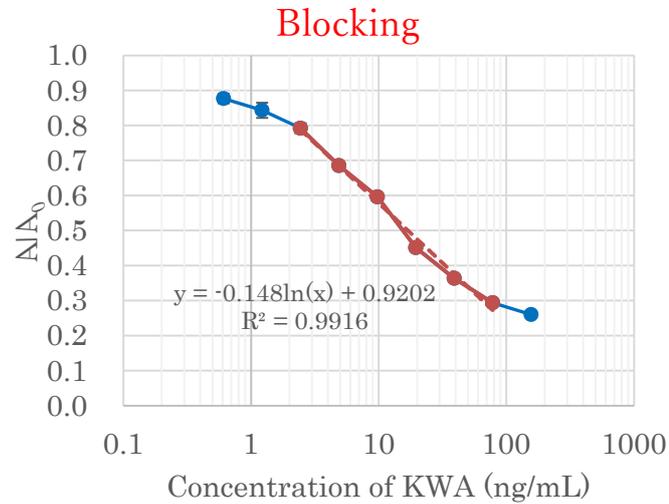


Fig. 5 PEs-biOVA を固相化した競合 ELISA 様アッセイ 2 の概略図

Figure 6

(A)



(B)

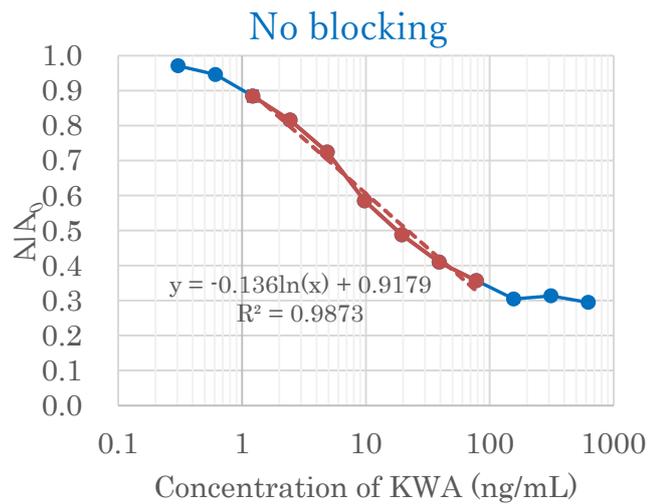


Fig. 6 間接競合 MPs-EIA におけるブロッキング操作の必要性の検討

(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 7**

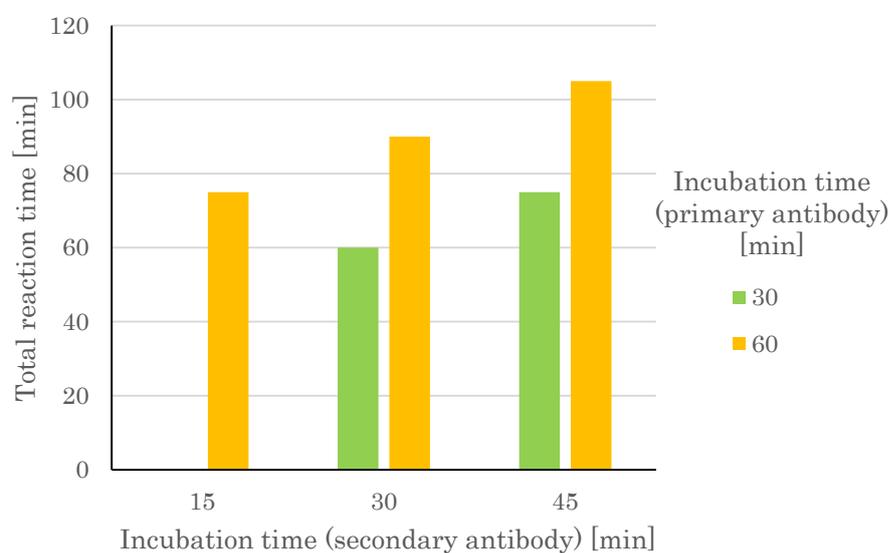


Fig. 7 間接競合 MPs-EIA の一次抗体及び二次抗体反応時間の検討  
一次抗体反応時間(30分と1時間)と二次抗体反応時間(15分、30分及び45分)と総反応時間

Figure 8

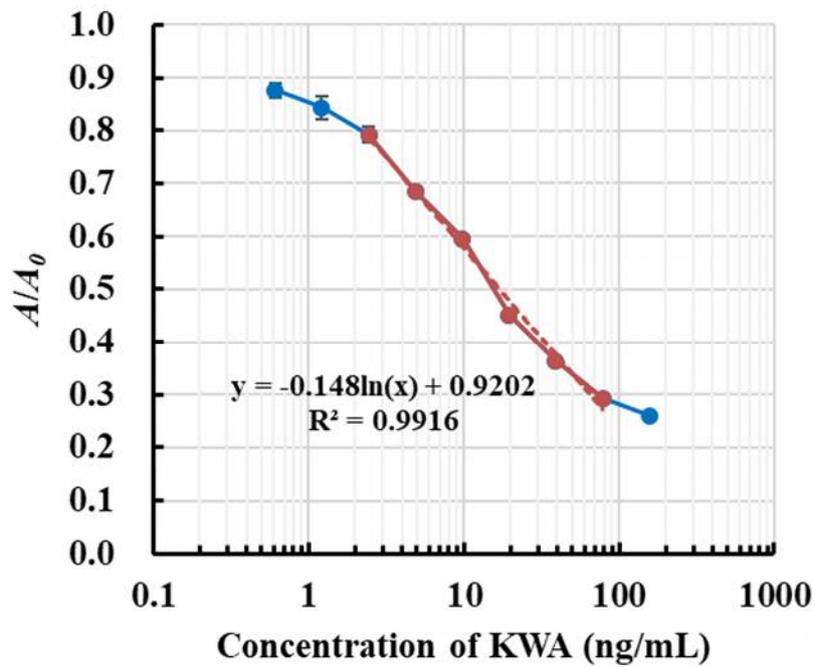


Fig. 8 最適化した間接競合 MPs-EIA における KWA の検量線

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

Figure 9

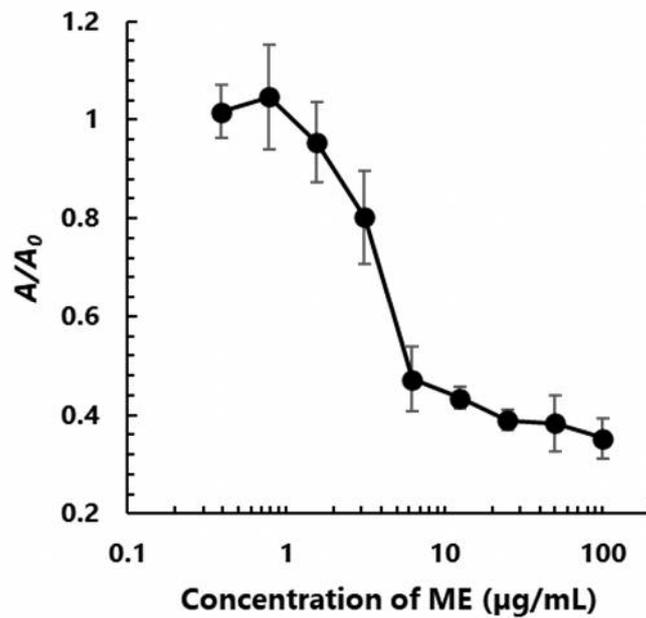
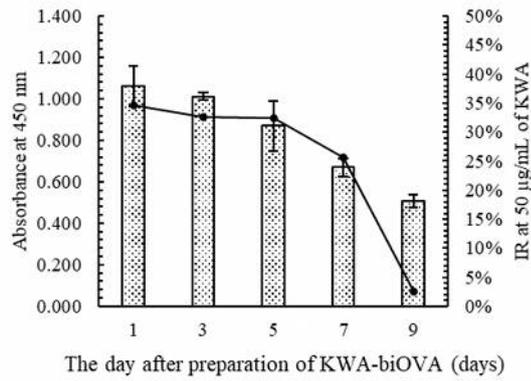


Fig. 9 競合 ELISA 様アッセイ 2 における ME の検量線

$A$  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 10

(A)



(B)

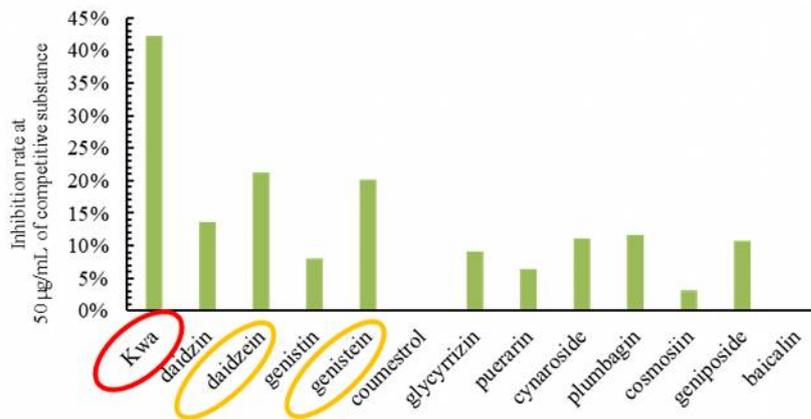


Fig. 10 KWA-biOVA の(A)安定性と(B)特異性の評価

Figure 11

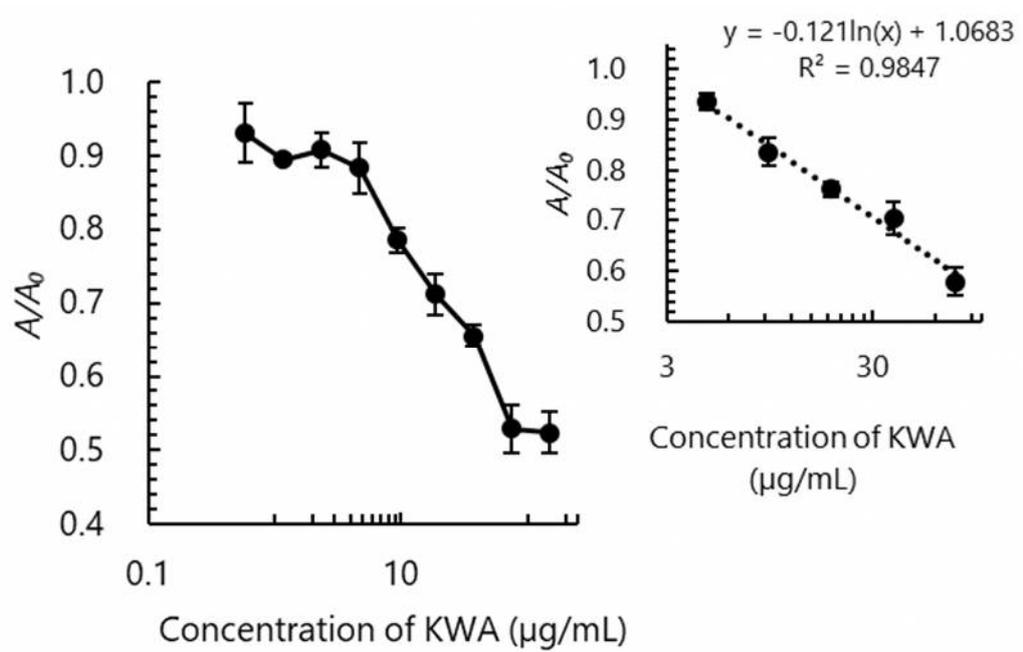


Fig. 11 間接競合 ELISA 様アッセイ 1 における KWA の検量線

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

Figure 12

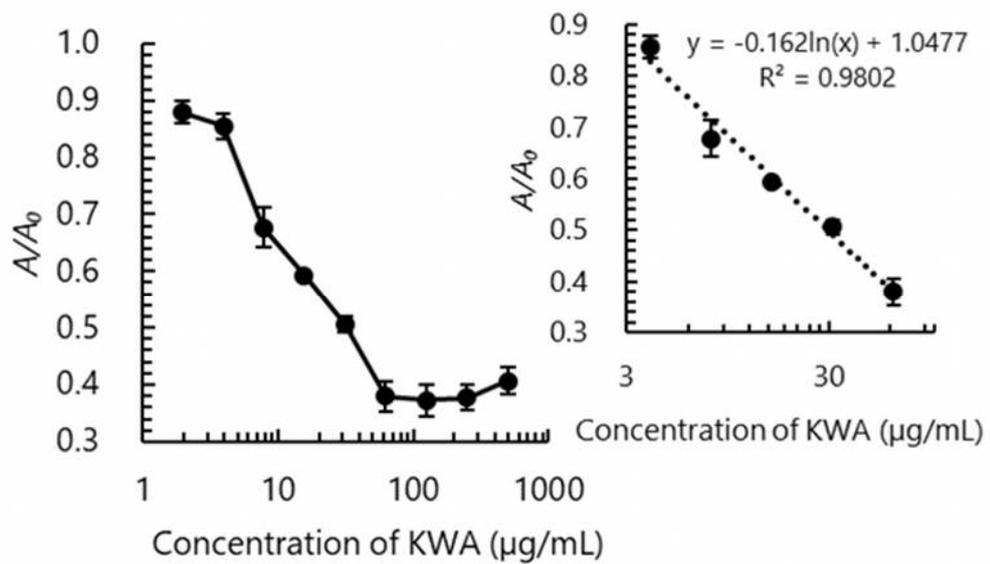


Fig. 12 競合 ELISA 様アッセイ 2 における KWA の検量線

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

Figure 13

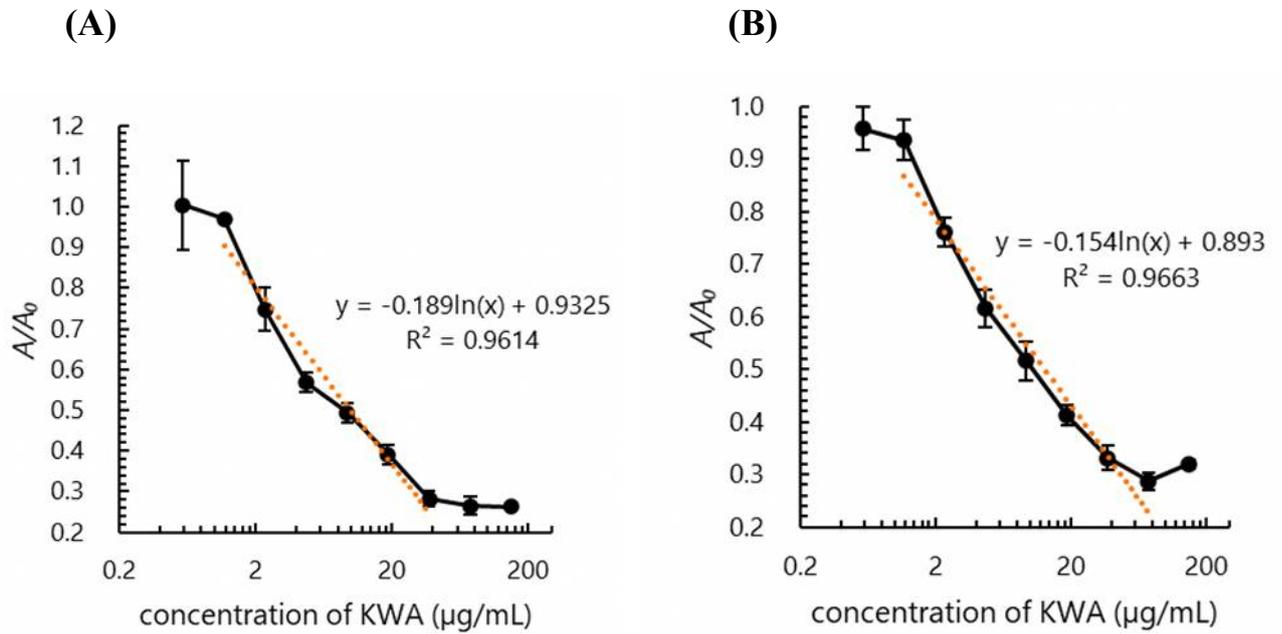


Fig. 13 (A) KWA-bimAb 2H2 又は、(B) KWA-bimAb 1D2 を用いた競

合 ELISA 様アッセイ 2 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、 $A_0$ は 450 nm での吸光度 (競合物質無し)を示している。

**Table 1:** MPs-EIA の信頼性の評価**(A)**

Concentration of KWA (ng/mL)	CV (%)	
	Intra- assay (n = 6)	Inter- assay (n = 5)
2.44	1.57	0.94
4.88	1.49	2.36
9.76	0.59	5.32
19.5	1.35	5.77
39.0	1.94	5.37
78.1	3.10	1.81

**(B)**

Sample name	MPs-EIA		icELISA	
	KWA amount (% wt./dry wt.)	CV (%)	KWA amount (% wt./dry wt.)	CV (%)
<i>P. mirifica</i> root bark 1	$2.35 \times 10^{-2}$	10.5	$2.39 \times 10^{-2}$	5.4
<i>P. mirifica</i> root bark 2	$4.71 \times 10^{-3}$	5.5	$3.07 \times 10^{-3}$	8.6
<i>P. mirifica</i> root without bark	$2.49 \times 10^{-4}$	3.1	$2.59 \times 10^{-4}$	4.7
Supplement 1	ND	ND	$2.61 \times 10^{-5}$	9.8
Supplement 2	$1.09 \times 10^{-2}$	8.9	$1.19 \times 10^{-2}$	5.5
Supplement 3	$4.16 \times 10^{-3}$	2.4	$6.01 \times 10^{-3}$	7.1
Supplement 4	$6.13 \times 10^{-4}$	11.4	$9.87 \times 10^{-4}$	8.5
Supplement 5	ND	ND	$3.12 \times 10^{-5}$	8.1

(A) Intra- inter-assay 試験及び(B) MPs-EIA と間接競合 ELISA を用いた  
KWA 定量値間の比較

**Table 2:** 添加回収試験による MPs-EIA の正確性の評価

Spiked amount of KWA (ng)	Measured amount of KWA (ng per 10 mg dry wt.)	CV (%)	Expected amount of KWA (ng per 10 mg dry wt.)	Recovery (%)
0	2525.45	5.4		
62.5	2583.20	8.1	2587.95	92.4
125	2669.82	6.9	2650.45	115.5
250	2768.99	3.6	2775.45	97.4
500	3009.50	5.3	3025.45	96.8
1,000	3565.49	5.1	3525.45	104.0

**Table 3:** 間接競合 ELISA 様アッセイ 1 の信頼性の評価**(A)**

Concentration of KWA ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)	
	Intra-assay (n = 6)	Inter-assay (n = 3)
4.69	7.4	3.3
9.38	1.5	4.9
18.8	3.0	3.2
37.5	3.1	7.5
75.0	6.5	2.6

**(B)**

Sample name	BIを用いた検出法 (ELISA様アッセイ1)		icELISA	
	KWA amount (% wt./dry wt.)	CV (%)	KWA amount (% wt./dry wt.)	CV (%)
<i>P. mirifica</i> root bark 1	$1.56 \times 10^{-2}$	12.1	$1.09 \times 10^{-2}$	8.2
<i>P. mirifica</i> root bark 2	$1.22 \times 10^{-3}$	6.2	$1.29 \times 10^{-3}$	0.4
<i>P. mirifica</i> root without bark	$4.23 \times 10^{-4}$	11.8	$1.94 \times 10^{-4}$	7.0
Supplement 1	$9.19 \times 10^{-5}$	4.3	$9.94 \times 10^{-6}$	10.3
Supplement 2	$7.09 \times 10^{-3}$	7.5	$6.23 \times 10^{-3}$	4.5
Supplement 3	$2.04 \times 10^{-3}$	8.1	$1.27 \times 10^{-3}$	5.0
Supplement 4	$3.36 \times 10^{-4}$	8.7	$2.38 \times 10^{-4}$	9.0
Supplement 5	ND	ND	$5.73 \times 10^{-6}$	9.4

(A) Intra- inter-assay 試験及び(B) 間接競合 ELISA 様アッセイ 1 と間接競合 ELISA を用いた KWA 定量値間の比較

**Table 4:** 競合 ELISA 様アッセイ 2 の信頼性の評価

(A)

Concentration of KWA ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)	
	Intra-assay (n = 6)	Inter-assay (n = 3)
3.91	6.4	3.8
7.81	7.4	7.0
15.6	4.6	6.0
31.2	4.6	6.7
62.5	8.7	5.6

(B)

Sample name	BIを用いた検出法 (ELISA様アッセイ2)		icELISA	
	KWA amount (% wt./dry wt.)	CV (%)	KWA amount (% wt./dry wt.)	CV (%)
<i>P. mirifica</i> root bark 1	$1.43 \times 10^{-2}$	7.2	$1.09 \times 10^{-2}$	8.2
<i>P. mirifica</i> root bark 2	$1.11 \times 10^{-3}$	9.3	$1.29 \times 10^{-3}$	0.4
<i>P. mirifica</i> root without bark	$4.49 \times 10^{-4}$	9.0	$1.94 \times 10^{-4}$	7.0
Supplement 1	ND	ND	$9.94 \times 10^{-6}$	10.3
Supplement 2	$9.65 \times 10^{-3}$	4.9	$6.23 \times 10^{-3}$	4.5
Supplement 3	$2.14 \times 10^{-3}$	9.3	$1.27 \times 10^{-3}$	5.0
Supplement 4	$4.12 \times 10^{-4}$	6.5	$2.38 \times 10^{-4}$	9.0
Supplement 5	ND	ND	$5.73 \times 10^{-6}$	9.4

(A) Intra- inter-assay 試験及び(B) 競合 ELISA 様アッセイ 2 と間接競合 ELISA を用いた KWA 定量値間の比較