

甘草含有医薬品による偽アルドステロン症発症を  
事前に回避のための検査キットの開発

名古屋市立大学大学院 薬学研究科医療機能薬学専攻  
生薬学分野 教授

まきの としあき  
牧野 利明

# 甘草含有医薬品による偽アルドステロン症発症を 事前に回避のための検査キットの開発

名古屋市立大学大学院薬学研究科 調査・研究実施者氏名 牧野 利明

## 【要旨】

甘草による副作用、偽アルドステロン症の発症には、個体差が大きく、甘草含有成分である glycyrrhizin を 3-*epi*-glycyrrhietinic acid (3-*epi*-GA) へ代謝する腸内細菌がその原因である可能性が高い。本研究では、尿中 3-*epi*-GA30G を簡便に測定するため、ヒト尿中からそれを簡便に検出するための ELISA の開発を目的に、3-*epi*-GA に対するモノクローナル抗体の作成を試みた。マウスにアジュバントともに 3-*epi*-GA を免疫し、それを認識する抗体を産生する脾臓細胞のハイブリドーマを作製した。しかし、GA と 3-*epi*-GA を選択的に識別できる抗体は得られなかった。現在、ハイブリドーマの選別からやり直し、そのような抗体の産生を目指している。

## 1、調査・研究目的

一般用医薬品として汎用されている甘草含有漢方製剤、生薬製剤には、偽アルドステロン症という副作用が知られている。その発症は、甘草の主要成分である glycyrrhizin (GL) の腸内細菌による代謝産物である glycyrrhietinic acid (GA) が、腎尿細管においてコルチゾルを代謝不活化する 11 $\beta$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ (HSD) II を阻害するためとされてきた。しかし、GA は甘草を摂取したほとんどの患者の血中から検出され、発症の個体差を説明することは出来ない。

これまで申請者は、その発症の個体差を説明できる偽アルドステロン症の真の原因物質を探索してきた。その結果、GL のヒト独自の代謝産物として 3-*epi*-GA とその 30 位のグルクロン酸抱合体 (3-*epi*-GA30G) を、甘草含有製剤を摂取したヒト血清、尿中からそれぞれ発見した (文献 1、2)。それらの保有には大きな個体差があり、それぞれのヒト検体中の濃度は偽アルドステロン症の診断基準である血中カリウム、アルドステロン濃度と有意な逆相関を示した。このことから、甘草含有製剤を服用直後に、血中に 3-*epi*-GA、尿中に 3-*epi*-GA30G を測定することにより、その患者における偽アルドステロン症を発症しやすい体質であるか否かを、副作用発症前に診断することが出来る可能性がある。

本研究では、尿中 3-*epi*-GA30G を簡便に測定するためのモノクローナル抗体を作成し、偽アルドステロン症を発症しやすい体質を患者自身が判断するための検査キットを開発し、未然に副作用を防ぐことを目的とする。

## 2、調査・研究方法

### 2-1 3-*epi*-GA のキャリアタンパク質への結合反応

3-*epi*-GA (5 mg) を 50% DMSO を含む炭酸緩衝液 (50 mM, pH 9.6) 1 mL に溶解し、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (3 mg) と N-hydroxysuccinimide (2.5 mg) を添加して、室温で 20 分間穏やかに攪拌した。続いて、得られた混合物を攪拌しながら、ヒト血清アルブミン (HSA) (5 mg) を溶解させた炭酸緩衝液 (2.0 mL) をゆっくりと滴下した。室温で 6 時間攪拌した後、得られた混合溶液を 4℃ で 50 時間蒸留水に対して透析した。透析内液を凍結乾燥して、3-*epi*-GA-HSA 抱合体を得た。

同様の方法により、3-*epi*-GA の keyhole limpet hemocyanin (KLH) との抱合体を得た。

### 2-2 マウスへの免疫

フロイント完全アジュバント (0.25 mL) と 3-*epi*-GA-KLH 抱合体 (25 µg) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, 0.25 mL) を合わせてエマルジョンを調製し、6 週齢のオス Balb/c マウスに腹腔内投与した。その 2 週間後と 4 週間後に、フロイント不完全アジュバント (0.25 mL) と 3-*epi*-GA-KLH 抱合体 (25 µg) を含む PBS (0.25 mL) を合わせてエマルジョンを調製し、同様にマウスに腹腔内投与した。最初の免疫の 6、8、10 週間後に、3-*epi*-GA-KLH 抱合体 (25 µg) を含む PBS (0.25 mL) を同様にマウスに腹腔内投与し、11 週間後にフロイント不完全アジュバント (0.25 mL) と 3-*epi*-GA-KLH 抱合体 (25 µg) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, 0.25 mL) を合わせて調製したエマルジョンをマウスに腹腔内投与した。最終免疫の 2 日後に、マウスから脾臓を摘出した。

### 2-3 ハイブリドーマの調製

脾臓細胞  $1.1 \times 10^8$  個とマウス骨髄腫由来 SP2/0-Ag14 細胞  $2.3 \times 10^7$  個とを合わせ、遠心して集めた細胞塊に 50% PEG1450 溶液を 1 mL を滴下して、タッピングによる懸濁させた。その後、1、3、10 mL ずつ e-RDF 培地を添加し、37℃ で 2 分、インキュベートした後、遠心し、さらに 37℃ で 5 分、インキュベートした。上清を吸引除去後、10% ウシ胎児血清 (FBS)、100 µM hypoxanthine、0.4 µM aminopterin および 16 µM thymidine を含む E-RDF 培地を 60 mL 加え、96 穴平底プレート 6 枚 (576 well) に 100 µl/well ずつ播種、37℃、5% CO<sub>2</sub> 下で 5 日間、インキュベートした。その後、同じ培地を 100 µl/well ずつ添加し、さらに 5 日間、同条件でインキュベートした。

後述する ELISA により、3-*epi*-GA に対する抗体の存在が確認でき、GA への認識と差が見られた well として 1A6 と 1H8 を選択し、それぞれから回収した 120 個の細胞を 10% FBS を含む E-RDF 培地 40 mL に懸濁し、2 枚の 96 穴平底培養プレートプレートに 200 µL/well ずつ無菌的に播種し、37℃、5% CO<sub>2</sub> 下で 10 日間、インキュベートした。

コロニーが観察できた well から培地を回収し、後述する ELISA を行い、GA と比較して

3-*epi*-GA に対する選択性が最も高かった優良クローンを選別した。

そのクローンをインスリン 5 mg、トランスフェリン 10 mg、エタノールアミン 1.53 mg、亜セレン酸ナトリウム 0.0043 mg を E-RDF 培地 1 L に添加した培地で培養し、培地を 500 mL 回収、Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow カラムを通し、カラムに吸着した IgG を、20 mL の 100 mM クエン酸緩衝液 (pH 2.7) で溶出することにより、anti-3-*epi*-GA モノクローナル抗体を得た。

## 2-4 ELISA

Nunc の 96 穴イムノプレート (Nagel Nunc, Penfield, NY, USA) に、50 mM carbonate buffer (pH 9.6) で希釈した 3-*epi*-GA-HSA 抱合体を 100  $\mu$ L/well ずつ添加し、37°C で 1 時間インキュベートして、抗原をプレートに固相化した。T-PBS で wells を 3 回洗浄後、ブロッキングを 250  $\mu$ L/well 添加し、室温で 2 時間～一晩インキュベートして、ブロッキングした。Can Get Signal® Solution 1 で適宜希釈した、ハイブリドーマから回収した培地と 0.1  $\mu$ M の GA または 0.1  $\mu$ M 3-*epi*-GA を混合したサンプルを添加して、4°C で一晩、インキュベートした。T-PBS で wells を 3 回洗浄後、二次抗体として 3,000 倍希釈した HRP- goat anti-mouse IgG を 100  $\mu$ L/well ずつ添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。T-PBS で wells を 3 回洗浄後、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) と過酸化水素水で発色させ、1 M 硫酸で反応を停止した後、450 nm の吸光度を測定した。

## 3、調査・研究成果

### 3-1 モノクローナル抗体の作成

3-*epi*-GA をキャリアタンパク質へ結合させ、3-*epi*-GA-HSA 抱合体を 8.2 mg、3-*epi*-GA-KLH 抱合体を 6.4 mg、得た。これをアジュバントとともにマウスに免疫し、脾臓細胞から骨芽腫細胞とハイブリドーマを調製し、576 wells の細胞集団から、3-*epi*-GA に対する選択性のある抗体を産生する 2 つの細胞集団、1A6 と 1H8 を得た。ELISA の結果、1A6 群の培地を GA、3-*epi*-GA それぞれ 1  $\mu$ M と反応させたときの吸光度は、それぞれ 0.323 と 0.111 で差が 0.212、1H8 群の培地では、それぞれ 1.601、1.396 で差は 0.205 だった。1A6 群、1H8 群に、3-*epi*-GA に選択的な抗体を作る細胞が含まれていることが示唆されたことから、この細胞集団から 120 個の細胞を限界希釈法により 1 well あたり 1 細胞以下になるように、96 穴プレートに培養し、残りを -150°C に凍結保存した。コロニーが得られた well として、1A6 で 6 wells、1H8 で 16 wells 得た。それぞれの well から培地を回収し、ELISA で確認したところ、GA と 3-*epi*-GA での間で差が見られたクローンは、1H8-1G5 (1.586/1.526)、1H8-1H6 (1.217/1.188)、1H8-2D8 (1.278/1.234) の 3 つのみであった。これらのうち、1H8-2D8 は、コロニーが大きく、ポリクローナル抗体となっている可能性があったため、1H8-1G5、1H8-

1H6 について、24 穴、6 穴、75 cm<sup>2</sup> フラスコと順次、細胞を増殖させ、それぞれ  $1.5 \times 10^4$  個、 $1.9 \times 10^4$  個の細胞まで増えた段階で、 $-150^{\circ}\text{C}$  に凍結保存するとともに、培地を 500 mL 回収した。その培地から、アフィニティーカラムによりモノクローナル抗体を得た。

得られたモノクローナル抗体から、ELISA の各種反応条件を変えることにより、GA、3-*epi*-GA に対する吸光度で最も差が現れる条件を探索したが、十分な条件を得ることが出来ず、クローニングからやり直すこととした。

現在、凍結してある 1A6 と 1H8 から、再度、優良クローンの選別を行うための準備をしている段階である。

#### 4、考察

GA に対するモノクローナル抗体は、すでに富士フイルム和光純薬から市販されている ELISA キットに使用されているほか、Hisaka ら 3) も開発している。これらのうち、Hisaka が開発したモノクローナル抗体は、3-*epi*-GA に対する親和性が低く、GA に選択性があることが示されている。このことは、裏を返せば GA を認識せず、3-*epi*-GA に対して選択性の高いモノクローナル抗体を調製できる可能性が高いことを示している。

しかし、優良なモノクローナル抗体の調製は、多くのハイブリドーマから選別する確率の問題であるため、今回の 120 個の細胞からでは、十分な選択性を持つモノクローナル抗体を得ることは出来なかった。今後、凍結してある 1A6 と 1H8 から限界希釈法により選別するための細胞数を増やし、少しでも当たりを得られる可能性を高めて、優良な抗 3-*epi*-GA 抗体を調製するための再チャレンジしていく。

#### 5、まとめ

3-*epi*-GA を抗原としてマウスを免疫することにより、モノクローナル抗体を得ることは出来たが、GA を認識せずに、3-*epi*-GA 高い選択性を持つモノクローナル抗体を得ることは出来なかった。

#### 6、調査・研究発表 (口頭又は誌上発表)

なし。

#### 7、引用文献

1. Makino T, et al. 3-*epi*-18  $\beta$  -glycyrrhetic acid or its glucuronide is correlated with

- individual differences in the development of licorice-induced pseudoaldosteronism in humans. *Drug Metab. Dispos.* 52:1407–1416, 2024.
2. Makino T, et al. Stereoisomerism at the 3-position of glycyrrhetic acid affects pseudoaldosteronism-related toxicokinetics. *Drug Metab. Dispos.* 53, 100180, 2025.
  3. Miyoshi S, et al. The development of immunological quantification method for glycyrrhetic acid in serum to estimate the potential risk for pseudoaldsteronism. *Planta Med.* (in press) doi: 10.1055/a-2802-8067

Title	Development of a test kit to prevent the onset of pseudoaldosteronism caused by licorice-containing medicines.
Name	Toshiaki MAKINO
Name of Affiliation	Department of Pharmacognosy, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City Univesity.
Address、 Tel	3-1 Tanabe-Dori, Mizuho-ku, Nagoya 4678603, Japan +81 52 836 3416

#### Abstract

The development of pseudoaldosteronism, a side effect of licorice, shows significant individual variation, and it is highly likely that intestinal bacteria that metabolize glycyrrhizin, a component of licorice, to 3-*epi*-glycyrrhetic acid (3-*epi*-GA) are the cause. In this study, in order to easily measure the glucuronic acid conjugate of 3-*epi*-GA in urine, we attempted to create a monoclonal antibody against 3-*epi*-GA to develop an ELISA for its simple detection from human urine. Mice were immunized with 3-*epi*-GA along with an adjuvant, and hybridomas of spleen cells that produce antibodies that recognize GA were created. However, antibodies that could selectively distinguish between GA and 3-*epi*-GA were not obtained. Currently, we are starting over from hybridoma selection and aiming to produce such antibodies.