

総 説

モノクローナル抗体による甘草の品質及び活性評価解析

森永 紀

第一薬科大学 和漢薬物学分野

Quantitative and functional analysis of licorice extract
using monoclonal antibody

Osamu Morinaga

*Department of Natural Medicines, Daiichi University of Pharmacy,
22-1, Tamagawa-cho, Minami-ku, Fukuoka, 815-8511, Japan*

1. 緒言

甘草は全漢方処方約 70%に配合される重要な生薬である¹⁾。甘草には多種のフラボノイドをはじめとする 500 種以上の成分が同定されているが、薬理活性から見るとトリテルペノイドのグリチルリチン（グリチルリチン酸）が重要である²⁻⁶⁾。甘草から抽出されるグリチルリチンは肝炎やアレルギーの治療薬として市販されている⁷⁾。また、味噌、醤油等の甘味料としての消費も多く、年間 8 千トンもの甘草が輸入されている⁸⁾。甘草は乾燥地帯に自生する植物で、主に中国からの輸入に依存しており、中国の甘草自生地では重要な換金作物として乱獲が進み、これに伴って砂漠化が進んでいるとの見解から 1999 年中国は砂漠化防止の名目で自生甘草の採取を厳しく規制する制限を設け、現在も自生種の採取は規制が強く、栽培化が奨励されている^{2,9-11)}。

以上のように大量の甘草を消費しているため、産地による品質の変動も大きい^{12,13)}。このため日本薬局方では甘草品種は *Glycyrrhiza uralensis* Fisher と *G. glabra* Linne (Leguminosae) の 2 種で、グリチルリチン含量は 2.5%以上と規定している¹⁴⁾。一般に HPLC（高速液体クロマトグラフィー）を用いてグリチルリチンを定量分析している¹⁵⁻²⁰⁾。

このように多くの甘草が消費され、膨大なサンプル中のグリチル

リチン含量を分析する必要があるので、分析感度と分析精度の改善、分析時間の短縮、前処理等を必要としない簡便法、HPLC で分析する際のメタノールやアセトニトリル等の有機溶媒を必要としない環境保全等を目的にグリチルリチンに対するモノクローナル抗体 (MAb) が作製され、本 MAb を用いた高感度分析法である Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法が確立されている²¹⁾。また、甘草に含まれる 500 種におよぶ多数の成分の中からグリチルリチンのみを発色できる新しい検出法が見出され、イースタンブロットィングと命名された^{21,22)}。さらに定量分析を可能とする新しいイースタンブロットィングの開発にも成功している²³⁾。

一方、各種評価系で追跡しながら生薬や漢方薬中の活性成分を特定することは容易ではなく、特定成分との相乗効果を解析するとなると一層の困難を極める。そこで、グリチルリチンに対する MAb を装着したアフィニティークラムが開発され、アフィニティークロマトグラフィーによりグリチルリチンのみをワンステップで単離できることが証明されている²⁴⁾。また、グリチルリチンのみを除去したエキスは、グリチルリチンノックアウトエキスと命名され、本エキスの活性を元の甘草エキスと比較することで抗炎症に関する活性評価解析が行われている²⁵⁾。本総説では、グリチルリチンに対する MAb (抗グリチルリチン MAb) の作製方法と ELISA、イースタンブロットィングによるグリチルリチンの定量・定性分析方法の開発と甘草の品質評価への応用、抗グリチルリチン MAb 装着イムノアフィニティークラムの作製と甘草エキスの活性評価解析への応用について述べる。

2. グリチルリチンに対するモノクローナル抗体の作製

不死性で高い増殖能をもつミエローマ細胞と抗体産生細胞の脾細胞を融合し、単クローン抗体を産生し続けるハイブリドーマ細胞を作製する方法 (細胞融合法) が 1970 年代に確立された²⁶⁾。ハイブリドーマが産生する MAb は、抗原認識能における選択性や質的に均一であることから、各種免疫化学分野で有用なツールとして利用されている。また、必要な時に高純度な抗体を調製できる利点を持つうえ、この細胞融合法は配糖体のような低分子化合物に対する抗体作製にも応用されている²⁷⁻³¹⁾。その場合、低分子化合物は免疫原性を有する高分子化合物との複合体を調製し、これを抗原とする必要がある。図 1 に示す通りグリチルリチンのグルクロン酸部分を過ヨウ素酸ナ

トリウムで処理し、糖部を開環し、そこへ牛血清アルブミン (BSA) を加え、グリチルリチン-BSA コンジュゲート (複合体) が調製された²¹⁾。複合体中のグリチルリチンの結合数は MALDI-tof MS を用いて測定され³²⁾、ハプテン数は 5 個と求められ、免疫原になり得ることが確認されている (図 2)。

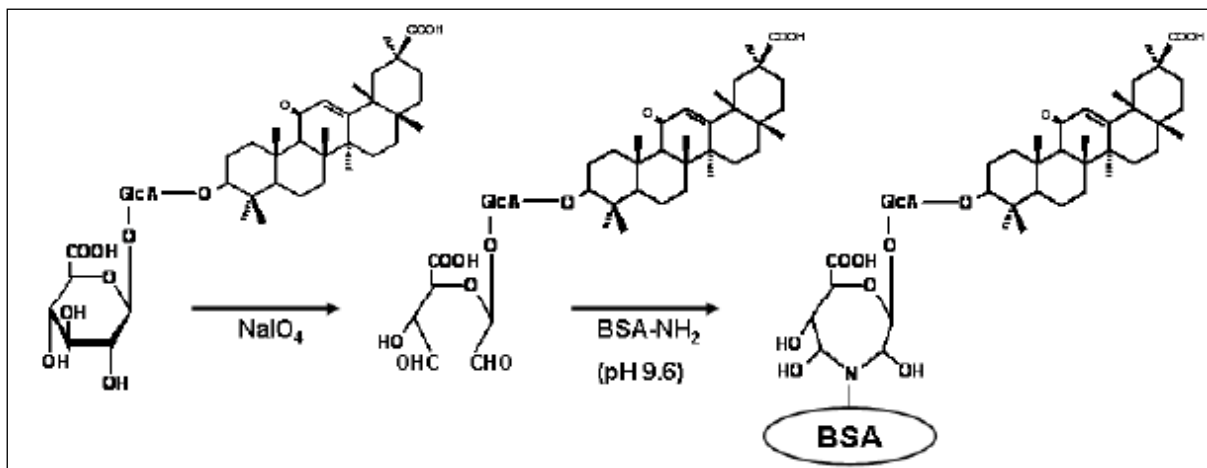


図 1 免疫原であるグリチルリチン-BSA の調製

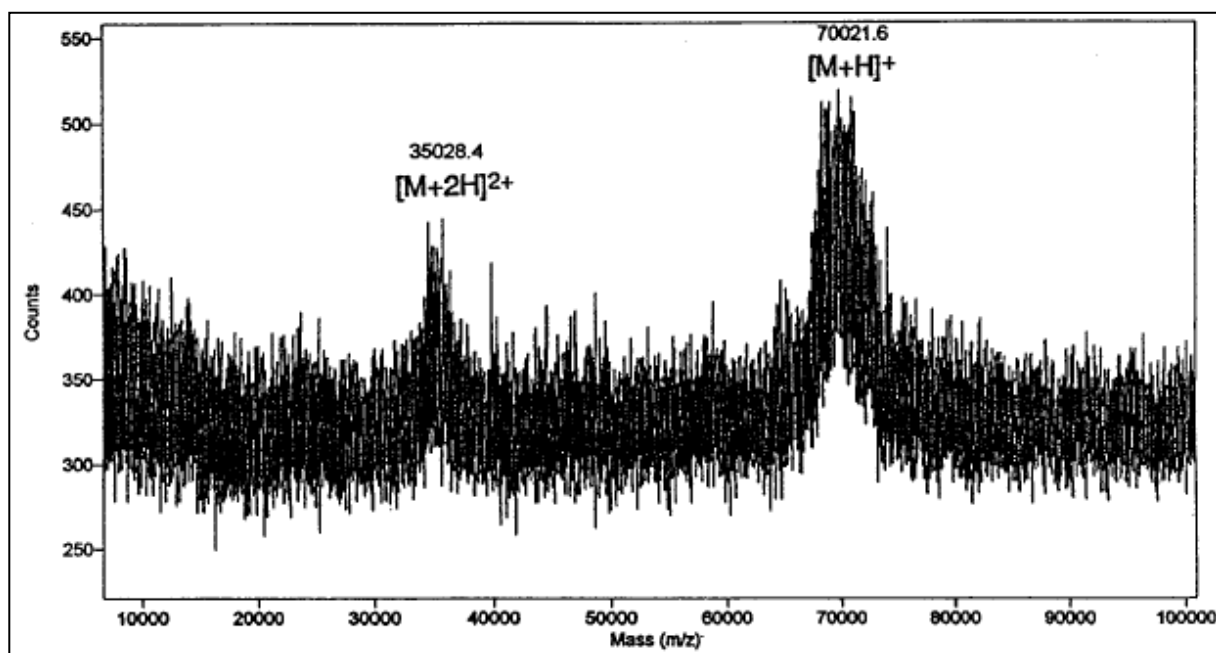


図 2 MALDI-tof MS によるグリチルリチン-BSA の分析

その後、グリチルリチン-BSA コンジュゲートをマウス腹腔内へ数回注射を行い、血中抗体価が上昇した時点で脾臓を摘出し、脾臓細胞とミエローマ細胞とをポリエチレングリコールを用いて細胞融合が行われ²⁶⁾、抗グリチルリチン MAb を産生する 4 種類のハイブリドーマ細胞を樹立し、その中でも MAb-5A8 と称する株がグリチルリチンに最も特異的な抗体を産生することを確認し、各種免疫化学的測定法への応用が行われた (表 1)。

表 1 抗グリチルリチン MAb の交差反応性

compound	5A8	5A5	4G6	5B4
glycyrrhizin	100	100	100	100
glycyrrhetic acid 3-O-glucuronide	4.36	46.30	73.50	81.03
glycyrrhetic acid	2.13	18.72	18.35	20.04
11-deoxy-18β-glycyrrhetic acid	2.32	5.45	11.37	1.17
18α-liquiritic acid	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
18β-liquiritic acid	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
11-deoxy-18β-liquiritic acid	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
deoxycholic acid	0.34	0.09	0.16	0.16
ursolic acid	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
oleanolic acid	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
hederagenin	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
betulin	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
lupeol	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
cholic acid	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
cholesterol	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
ginsenoside Rb1	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
saikosaponin a	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
solamargine	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
solasonine	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
digitonin	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
ergosterol	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02
β-sitosterol	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02

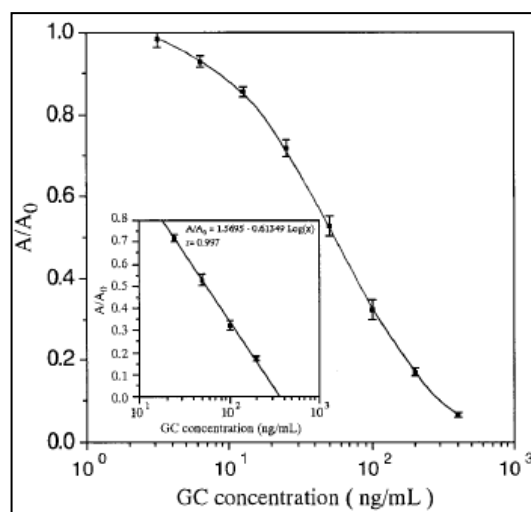


図 3 グリチルリチンの検量線

3. 競合的 ELISA の開発

抗グリチルリチン MAb-5A8 を用いた競合法による酵素標識免疫吸着測定法 (ELISA) の確立が行われた。ELISA で用いるイムノプレートにグリチルリチンを固定化させることは困難なため、免疫原とは異なる高分子化合物との複合体 (グリチルリチン-ヒト血清アルブミン) を固相化抗原として用い、図 3 に示すように 20~200 ng/ml の濃度範囲でグリチルリチンの検量線が作成された。感度は概ね HPLC 法の約千倍高く、各種甘草サンプル中のグリチルリチン含量を測定した結果、得られた測定値は HPLC 法による測定値と近似していた。以上から、本抗体を用いた ELISA 法が高い感度と信頼性を持つグリチルリチンの定量方法であることが検証できた³³⁾。

4. 新規イースタンプロットティングの開発

蛋白やペプチド等に対しては電気泳動等によりまず分離を行い、ナイロン膜・PVDF膜へ転写して膜上で抗原抗体反応により染色するウエスタンプロットティングが繁用されている³⁴⁾。しかしながらグリチルリチンのような配糖体に対しては分離能が低いため、通常のゲル等是用いられず、分離能の優れた薄層クロマト (TLC) を用いるのが一般的である^{19,20)}。しかし、分析対象物である配糖体の検出のための発色を容易に行うことが出来ない場合があり、TLCプレート上で抗体を用いて抗原抗体反応により直接染色することは極めて困難である。そこで、新たに開発されたイースタンプロットティングは、薬用成分のような低分子化合物をプラスチャージを施したポリエーテルスルホン (PES) 膜によりそれぞれの成分に分離し、直接膜上でMAbを用いて抗原抗体反応により染色し、それら染色スポットをNIH Image画像解析ソフトにより分析し、それぞれの成分を高感度に定量分析するという方法論である³⁵⁻³⁹⁾。また酵素標識二次抗体や基質の色を変えることで2重、3重抗体染色が可能であり、複数の生薬が含まれる漢方薬中の多数の薬用成分を同時にビジュアル的に分析することが出来る説得力の大きな手法でもある^{22,40,41)}。図4は、新規イースタンプロットティングの概略図である。また本法により甘草ならびに漢方薬を分析した結果、図5に示すようにグリチルリチンのみが明瞭に検出された。本法の応用としてグリチルリチン量と発色スポットのエリア面積からグリチルリチンの検量線を作成することができ、表2に示すように各種甘草及び漢方薬に含まれるグリチルリチン量は、HPLC法による定量値と近似しており、新規イースタンプロットティングが信頼性の高い分析方法であることも確認された²³⁾。

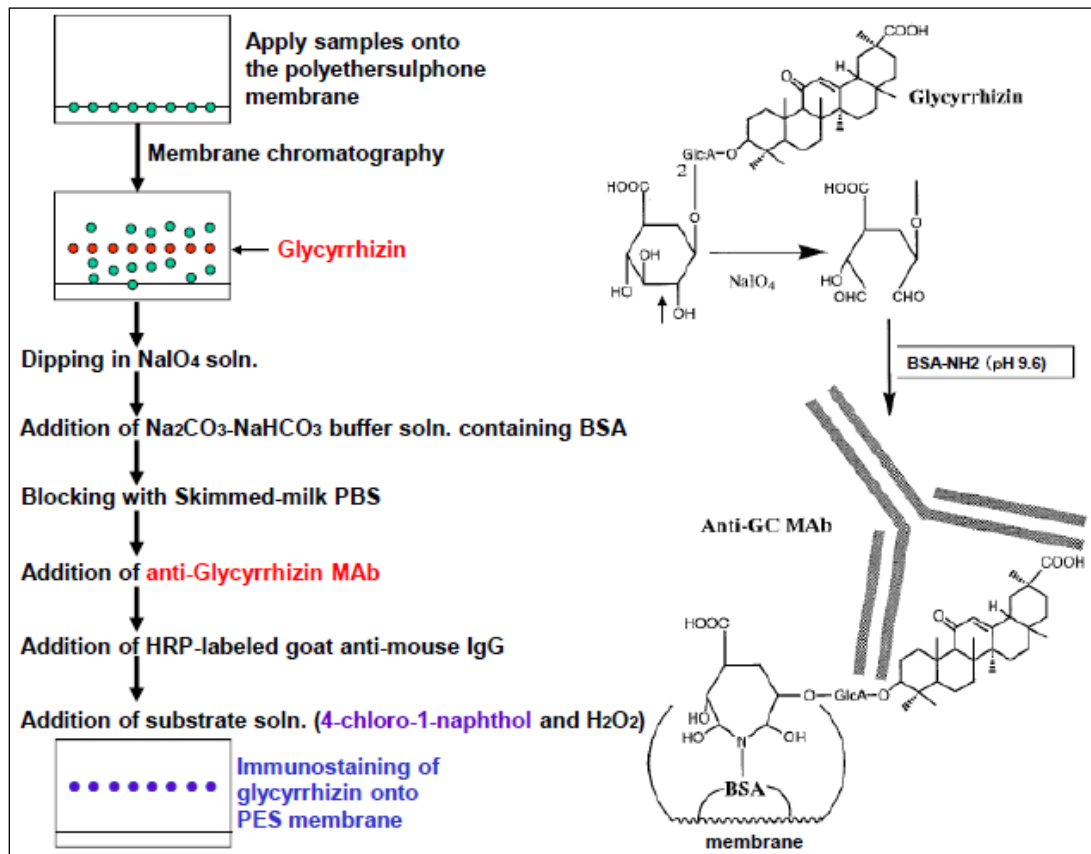


図4 新規イースタンブロッティングの概略図

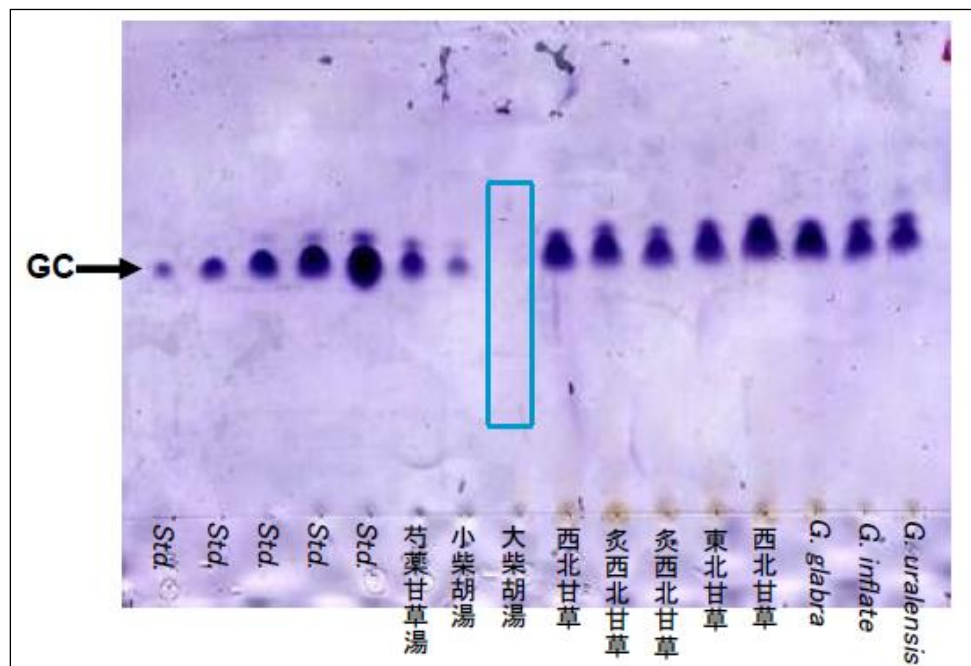


図5 新規イースタンブロッティングによる甘草及び漢方薬中のグリチルリチンの分析

表2 甘草及び漢方薬中のグリチルリチンの定量分析

サンプル	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mg}$ dry weight powder)	
	NIH Image	HPLC
芍薬甘草湯	6.0 \pm 0.2	6.2 \pm 0.1
小柴胡湯	2.5 \pm 0.4	1.9 \pm 0.2
大柴胡湯	ND	ND
西北甘草	25.3 \pm 4.7	25.1 \pm 0.2
炙西北甘草	24.5 \pm 2.7	26.3 \pm 0.2
炙西北甘草	20.1 \pm 1.0	21.8 \pm 0.1
東北甘草	26.1 \pm 2.3	23.3 \pm 0.4
西北甘草	48.7 \pm 5.8	42.2 \pm 0.4
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	36.2 \pm 3.4	37.4 \pm 0.1
<i>G. inflata</i>	25.9 \pm 2.3	22.0 \pm 0.7
<i>G. uralensis</i>	28.0 \pm 3.1	38.6 \pm 0.4

5. アフィニティークロマトグラフィーによるグリチルリチンノックアウトエキスの調製およびグリチルリチンの単離

アフィニティークロマトグラフィーは吸着クロマトグラフィーの一種であり、精製される物質は、不溶性の支持体（マトリックス）に固定された結合物質（リガンド）に特異的可逆的に吸着される。精製の度合いはしばしば数千倍にも達し、活性な物質の回収率は非常に高いのが特徴であり、多くのめざましい分離が一段階で達成され、選択性の低い多段階方法に比べて大幅な時間の節約ができる^{24, 43, 44)}。アフィニティークロマトグラフィーには濃縮効果があり、大量の試料も容易に処理することができる。

作製した抗グリチルリチン MAb をアガロースゲルに結合し、抗体装着アフィニティークロマトグラフィーを調製、カラムに充填しアフィニティークロマトグラフィーカラムが作製された（図 6）²⁴⁾。甘草の粗エキスをアフィニティークロマトグラフィーカラムに付し、バッファー中で抗原抗体反応を行う。この間にグリチルリチンはカラムの抗体部分へ結合する。一方で、グリチルリチン以外の成分はカラムへ結合することなくカラムを素通りする。この画分にはグリチルリチンは混在せず、すなわち甘草粗エキスからグリチルリチンのみが除去されたエキス（グリチルリチンノックアウト

トエキスと命名) が調製されたことになる (図 6)。その後、30%メタノールを用いて抗体に結合しているグリチルリチンを溶出し、グリチルリチンのワンステップ単離が完結される。

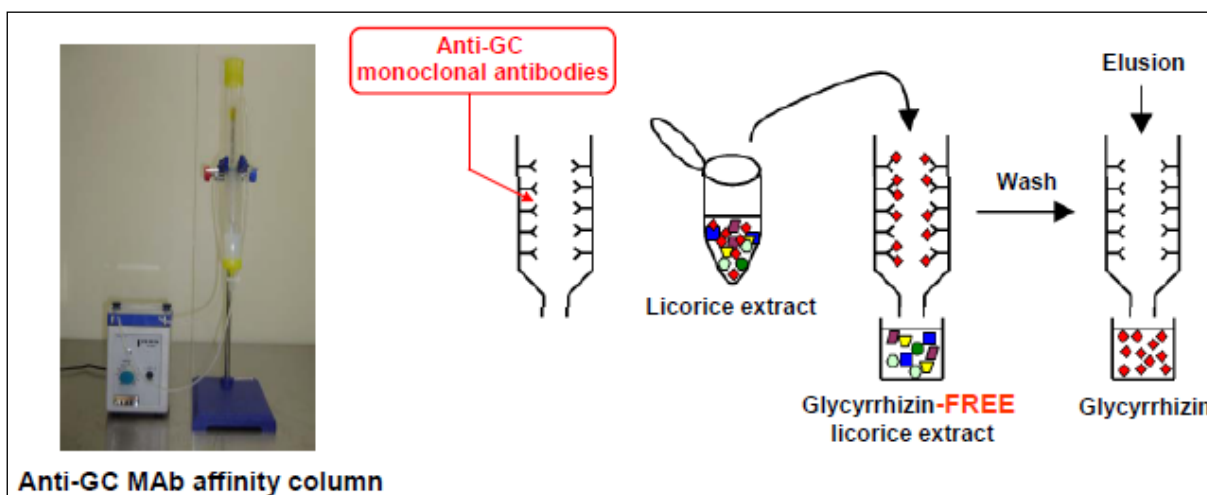


図 6 抗グリチルリチン MAb 装着アフィニティーカラムによるグリチルリチンノックアウトエキスの調製とグリチルリチンの単離

6. グリチルリチンノックアウトエキスを用いた甘草の活性評価解析

甘草には抗腫瘍、抗炎症をはじめとする多くの薬理活性が知られており、また主有効成分のグリチルリチンには肝庇護作用や抗ウイルス作用等が明らかとなっており、肝炎治療薬として臨床応用されている²⁻⁶⁾。また甘草に含まれるフラボノイド類にも抗炎症や抗腫瘍作用が近年報告されている⁴⁵⁻⁵¹⁾。しかしながら、甘草に含まれる多数の成分とグリチルリチンとの薬理活性における関わりについての詳細な研究はなされていない。そこでマウスマクロファージ様細胞 (RAW264) における一酸化窒素合成酵素 (iNOS) 発現抑制効果およびヒト前骨髄性白血病細胞 (HL-60) におけるアポトーシス誘導能を中心に、グリチルリチン単独、甘草粗エキスおよびグリチルリチンノックアウトエキスを用いて、甘草の活性評価ならびにグリチルリチンの作用機構の解析が行われた²⁵⁾。

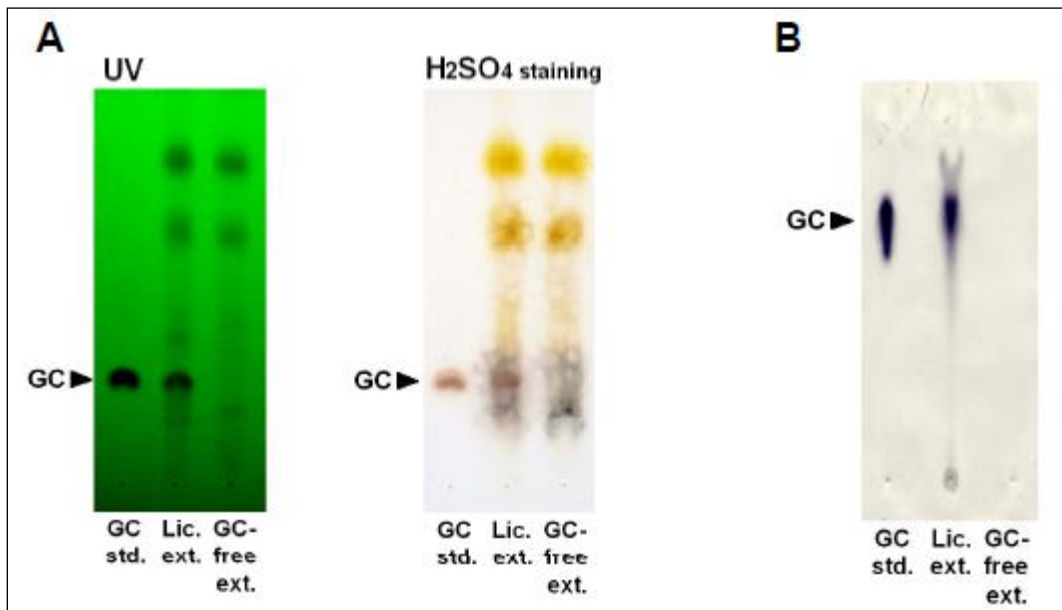


図7 TLC (A) 及び新規イースタンブロットィング (B) によるグリチルリチンノックアウトエキスの確認

RAW264 細胞において、甘草エキスはリポ多糖 (Lipopolysaccharide: LPS) 誘導性 NO 産生、iNOS 蛋白質および mRNA 発現を濃度依存的に抑制し、さらに NF- κ B 活性化を抑制していることが判明した。しかし、グリチルリチン単独では NO 抑制効果を示さなかった。次にグリチルリチンの詳細な役割を調べるために、抗グリチルリチン MAb 装着アフィニティーカラムを作製し、甘草エキスからグリチルリチンのみを除去したグリチルリチンノックアウトエキスが調製された (図 6)。図 7 は得られたグリチルリチンノックアウトエキスを TLC と新規イースタンブロットィングにより分析した結果である。グリチルリチンノックアウトエキスにおいては NO および iNOS 発現抑制効果は弱まり、グリチルリチンノックアウトエキスにグリチルリチンを添加するとその効果は回復した (図 8)。さらに、抗グリチルリチン MAb を用いた ELISA および免疫蛍光染色により、グリチルリチンは時間依存的に細胞内に取り込まれ、細胞質内に存在していることが明らかとなった (図 9)。

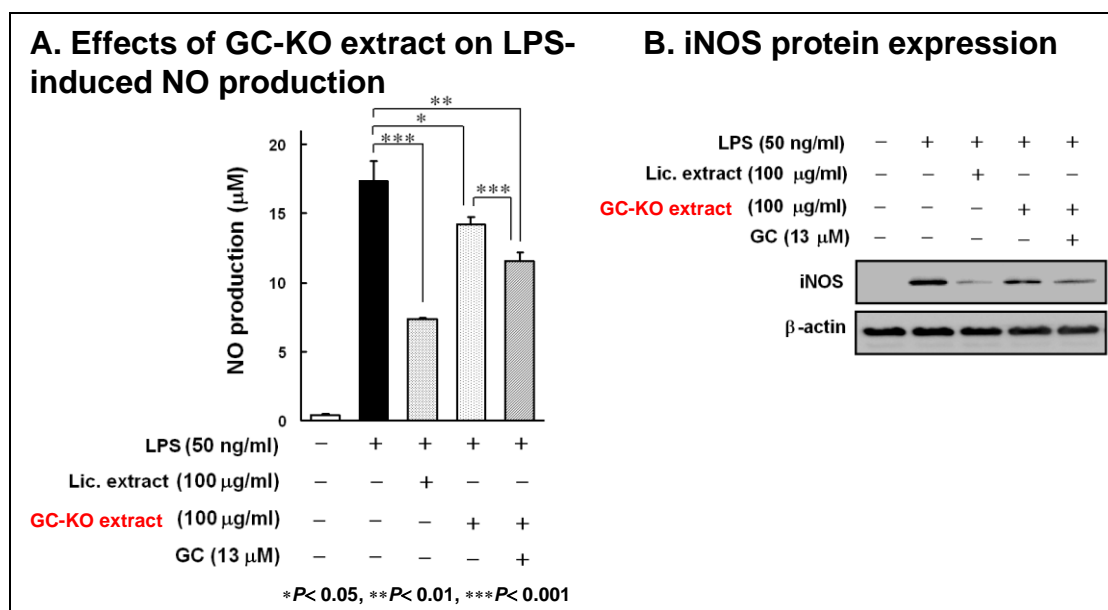


図 8 マクロファージ様細胞におけるグリチルリチン KO エキスの LPS 誘導性 NO 産生及び iNOS 蛋白質発現抑制効果

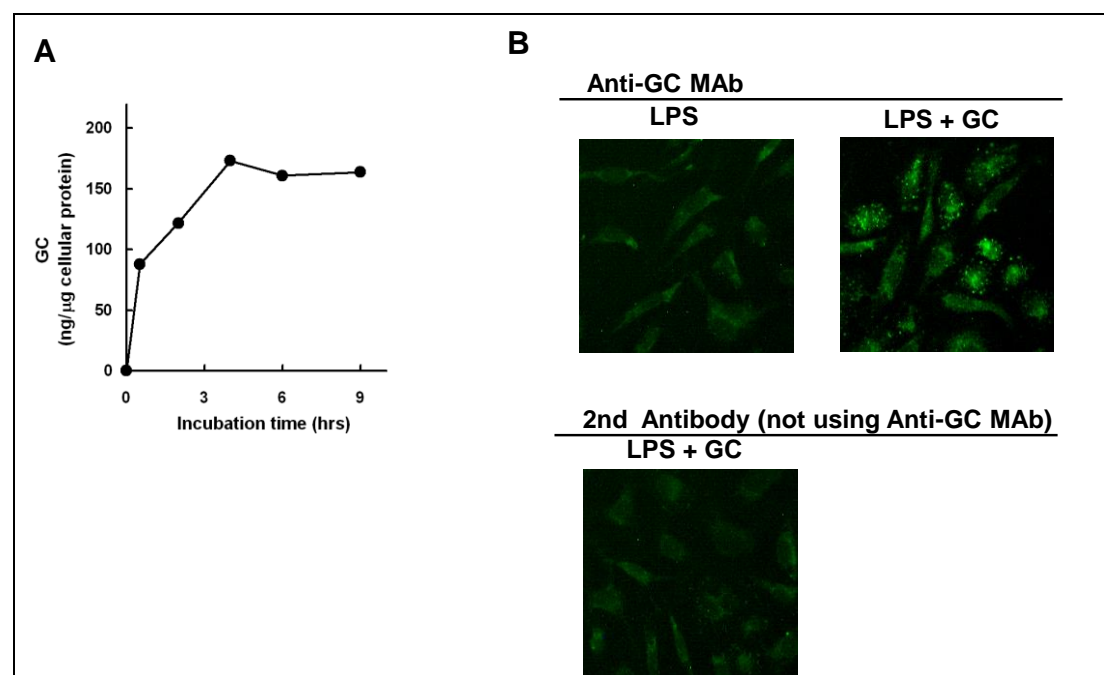


図 9 マクロファージ様細胞におけるグリチルリチンの蓄積 (A) 及び細胞内局在の確認 (B)

以上の結果は、グリチルリチンは甘草に含まれるグリチルリチン以外の成分と共存することで最大の効果を発揮できることを意味し、グリチルリチンが他成分との相乗効果を生み出していることが示唆された。

7. まとめ

免疫化学的測定法が生薬の有効成分を迅速、簡便、高感度に分析できることを甘草の有効成分グリチルリチンに対する MAb を用いた ELISA 法を用いて紹介した。ELISA 法においては 1 枚のイムノプレートを用いて同時に最大 96 サンプルの分析が可能であり、臨床検査や創薬におけるスクリーニングの現場でも威力を発揮している。

イースタンブロッティングは目的とする有効成分の構造を精密に認識する抗体をツールとすることで、ターゲット分子を選択的、ビジュアル的に検出でき、ELISA 法と同様に多検体一斉分析を可能とするユニークな分析法といえる。

生薬や漢方薬から活性成分と目されている成分のみを除いたノックアウトエキスと元のエキスとの活性を比較することで、真の活性成分や成分間の相互作用を解明できることが示唆された。

今回紹介した抗グリチルリチン MAb の作製とその応用は、生薬及び漢方薬の生体内代謝・体内動態研究を展開する際にも強力なツールとなり得るものであり、漢方薬の効果を科学的に解明する際にも応用が期待される。

参考文献

- 1) Kitagawa, I. Licorice root. A natural sweetener and an important ingredient in Chinese medicine. *Pure Appl. Chem.* 74, 1189-1198, 2002.
- 2) Ohtsuki, K. Ishida, N. Inhibitory effect of glycyrrhizin on polypeptide phosphorylation by polypeptide-dependent protein kinase (Kinase P) invitro. *Biochem Biophys Res Comm* 157, 597-604, 1988.
- 3) Doll, R. Hill, ID. Hutton, C. Underwood, DL. Clinical trial of a triterpenoid liquorice compound in gastric and duodenal ulcer. *Lancet.* 2, 793-796, 1962.

- 4) Pompei, R. Flore, O. Marccialis, MA. Pani, A. Loddo, B. Glycyrrhizic acid inhib-its virus growth and inactivates virus particles. *Nature*. 281, 689-690, 1979.
- 5) Kuroyanagi, T. Saito, M. Effect of prednisolone and glycyrrhizin on passive transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *Jpn J Allergol*. 15, 67-74, 1966.
- 6) Fujita, H. Sakurai, T. Toyoshima, S. Studies on the regulation by drug against ex-perimental hepatitis (1). *Pharmacometrics*. 16, 637-645, 1978.
- 7) Hayashi, H. Sudo, H. Economic importance of licorice. *Plant Biotech*. 26, 101-104, 2009.
- 8) Isao, K. Licorice root. A natural sweetener and an important ingredient in Chinese medicine. *Pure Appl. Chem*. 74, 1189-1198, 2002.
- 9) Ozaki, K. Shibano, M. Aim for production of *Glycyrrhizae Radix* in Japan (3): development of a new licorice cultivar. *J. Nat. Med*. 68, 358-362, 2014.
- 10) Marui, A. Nagafuchi, T. Shinogi, Y. Yasufuku, N. Omine, K. Kobayashi, T. Shinkai, A. Tuvshintokh, I. Mandakh, B. Munkhjargal, B. Soil Physical Properties to Grow the Wild Licorice at Semi-arid Area in Mongolia. *Journal of Arid Land Studies*. 22, 33-36, 2012.
- 11) Fujii, S. Tuvshintogtokh, I. Mandakh, B. Munkhjargal, B. Uto, T. Morinaga, O. Shoyama, Y. Screening of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. ex DC. containing high concentrations of glycyrrhizin by Eastern blotting and enzyme-linked immunosorbent assay using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody for selective breeding of licorice. *J. Nat. Med*. 68, 717-722, 2014.
- 12) Kondo, K. Shiba, M. Nakamura, R. Morota, T. Shoyama, Y. Constituent properties of licorices derived from *Glycyrrhiza uralensis*, *G. glabra*, or *G. inflata* identified by genetic information. *Biol. Pharm. Bull*. 30, 1271-1277, 2007.
- 13) Hayashi, H. Hattori, S. Inoue, K. Sarsenbaev, K. Ito, M. Honda, G. Field survey of *Glycyrrhiza* plants in Central Asia (1). Characterization of *G. uralensis*, *G. glabra* and the putative intermediate collected in Kazakhstan. *Biol. Pharm. Bull*. 26, 867-871, 2003.
- 14) The Japanese Pharmacopoeia, 17th.; HirokawaShoten: Tokyo,

- Japan, pp 1774-1776, 2016.
- 15) Yang, L. Li, LL. Liu, TT. Zu, YG. Yang, FJ. Zhao, CJ. Zhang, L. Chen, XQ. Zhang, ZH. Development of sample preparation method for isoliquiritigenin, liquiritin, and glycyrrhizic acid analysis in licorice by ionic liquids-ultrasound based extraction and high-performance liquid chromatography detection. *Food Chem.* 138, 173-179, 2013.
 - 16) Spinks, EA. Fenwick, GR. The determination of glycyrrhizin in selected UK liquorice products. *Food Addit. Contam.* 7, 769-778, 1990.
 - 17) Sabbioni, C. Ferranti, A. Bugamelli, F. Forti, GC. Raggi, MA. Simultaneous HPLC analysis, with isocratic elution, of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in liquorice roots and confectionery products. *Phytochem. Anal.* 17, 25-31, 2006.
 - 18) Kvasnicka, F. Voldrich, M. Vyhnálek, J. Determination of glycyrrhizin in liqueurs by on-line coupled capillary isotachopheresis with capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 1169, 239-242, 2007.
 - 19) Gantait, A. Pandit, S. Nema, NK. Mukjerjee, PK. Quantification of glycyrrhizin in *Glycyrrhiza glabra* extract by validated HPTLC densitometry. *J. AOAC Int.* 93, 492-495, 2010.
 - 20) Siddiqui, NA. Alam, P. Parvez, MK. Basudan, OA. Al-Dosari, MS. Al-Rehaily, AJ1. Al-Ajmi, MF. Shakeel, F. Quantification of glycyrrhizin in anti-stress herbal formulations by validate HPTLC method: a rational paradigm towards quality control of herbals. *Pak. J. Pharm. Sci.* 28, 353-357, 2015.
 - 21) Shan, SJ. Tanaka, H. Shoyama, Y. 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, 2001.
 - 22) Fujii, S. Morinaga, O. Uto, T. Nomura, S. Shoyama, Y. Development of double eastern blotting for major licorice components, glycyrrhizin and liquiritin for chemical quality control of licorice using anti-glycyrrhizin and anti-liquiritin monoclonal antibodies. *J. Agric. Food Chem.* 64(5), 1087-1093, 2016.
 - 23) Morinaga, O. Fujino, A. Tanaka, H. Shoyama, Y. An on-membrane quantitative analysis system for glycyrrhizin in licorice roots and

- traditional Chinese medicines, *Anal Bioanal Chem* 383, 668-672, 2005.
- 24) Xu, J. Tanaka, H. Shoyama, Y. One-step immunochromatographic separation and ELISA quantification of glycyrrhizin from traditional Chinese medicines. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 850, 53-58, 2007.
 - 25) Uto, T. Morinaga, O. Tanaka, H. Shoyama, Y. Analysis of the synergistic effect of glycyrrhizin and other constituents in licorice extract on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production using knock-out extract. *Biochem Biophys Res Commun.* 417(1), 473-478, 2012.
 - 26) Kohler, G. Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497, 1975.
 - 27) Weiler, E.W. Kruger, H. Zenk, M.H. Radioimmunoassay for the determination of the steroidal alkaloid solasodine and related compounds in living plants and herbarium specimens. *Planta Med.* 39, 112-124, 1980.
 - 28) Li, XW. Morinaga, O. Tian, M. Uto, T. Yu, J. Shang, MY. Wang, X. Cai, SQ. Shoyama, Y. Development of an Eastern blotting technique for the visual detection of aristolochic acids in *Aristolochia* and *Asarum* species by using a monoclonal antibody against aristolochic acids I and II. *Phytochem. Anal.* 24, 645-653, 2013.
 - 29) Paudel, MK. Shirota, O. Sasaki-Tabata, K. Tanaka, H. Sekita, S. Morimoto, S. Development of an enzyme immunoassay using a monoclonal antibody against the psychoactive diterpenoid salvinorin A. *J. Nat. Prod.* 76, 1654-1660, 2013.
 - 30) Sakamoto, S. Pongkitwitoon, B. Nakahara, H. Shibata, O. Shoyama, Y. Tanaka, H. Morimoto, S. Fluobodies against bioactive natural products and their application in fluorescence-linked immunosorbent assay. *Antibodies* 1, 239-258, 2012.
 - 31) Fu, X. Wang, A. Wang, X. Lin, F. He, L. Lai, D. Liu, Y. Li, QX. Zhou, L. Wang, B. Development of a monoclonal antibody-based icELISA for the detection of ustiloxin B in rice false smut balls and rice grains. *Toxins* 7, 3481-3496, 2015.
 - 32) Li-Jiang, X. Tanaka, H. Morimoto, S. Shoyama, Y. Akanuma, H.

- Muraoka, K. Determination of 1,5-anhydro-glucitol-carrier protein conjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization tof mass spectrometry and antibody formation. *Spectroscopy*. 14, 85-92, 2000.
- 33) Tanaka, H. Shoyama, Y. Formation of a monoclonal antibody against glycyrrhizin and development of an ELISA. *Biol. Pharm. Bull.* 21, 1391-1393, 1998.
- 34) Towbin, H. Staehelin, T. Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets – procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350-4354, 1979.
- 35) Morinaga, O. Fukuda, N. Tanaka, H. Shoyama, Y. Chromatographic resolution of glucosidic compounds, ginsenosides on polyethersulphone membrane, and its application to the quantitative immunoassay for ginseng saponins. *Glycobiology* 15, 1061-1066, 2005.
- 36) Morinaga, O. Tanaka, H. Shoyama, Y. Detection and quantification of ginsenoside Re in ginseng samples by a chromatographic immunostaining method using monoclonal antibody against ginsenoside Re. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 830(1), 100-104, 2006.
- 37) Morinaga, O. Zhu, S. Tanaka, H. Shoyama, Y. Visual detection of saikosaponins by on-membrane immunoassay and estimation of traditional Chinese medicines containing Bupleuri radix. *Biochem Biophys Res Commun.* 346(3), 687-692, 2006.
- 38) Morinaga, O. Uto, T. Yuan, CS. Tanaka, H. Shoyama, Y. Evaluation of a new eastern blotting technique for the analysis of ginsenoside Re in American ginseng berry pulp extracts. *Fitoterapia.* 81(4), 284-8, 2010.
- 39) Morinaga, O. Shoyama, Y. Development of new staining technology "eastern blotting" using monoclonal antibody. *Curr Drug Discov Technol.* 8(1), 42-50, 2011.
- 40) Fukuda, N. Tanaka, H. Shoyama, Y. Double staining of ginsenosides by Western blotting using anti-ginsenoside Rb1 and Rg1 monoclonal antibodies. *Biol Pharm Bull.* 24(10), 1157-1160, 2001.
- 41) Morinaga, O. Uto, T. Sakamoto, S. Putalun, W. Lhieochaiphant, S. Tanaka, H. Shoyama, Y. Development of eastern blotting technique for sennoside A and sennoside B using anti-sennoside A and

- anti-sennoside B monoclonal antibodies. *Phytochem Anal.* 20(2), 154-158, 2009.
- 42) Fukuda, N. Tanaka, H. Shoyama, Y. Isolation of the pharmacologically active saponin ginsenoside Rb1 from ginseng by immunoaffinity column chromatography. *J Nat Prod.* 63(2), 283-285, 2000.
- 43) Fukuda, N. Tanaka, H. Shoyama, Y. Applications of ELISA, western blotting and immunoaffinity concentration for survey of ginsenosides in crude drugs of *Panax* species and traditional Chinese herbal medicines. *Analyst.* 125(8), 1425-1429, 2000.
- 44) Tanaka, H. Fukuda, N. Shoyama, Y. Eastern blotting and immunoaffinity concentration using monoclonal antibody for ginseng saponins in the field of traditional chinese medicines. *J Agric Food Chem.* 55(10), 3783-7, 2007.
- 45) Kim, YM. Kim, TH. Kim, YW. Yang, YM. Ryu, da, H. Hwang, SJ. Lee, JR. Kim, SC. Kim, SG. Inhibition of liver X receptor- α -dependent hepatic steatosis by isoliquiritigenin, a licorice antioxidant flavonoid, as mediated by JNK1 inhibition. *Free Radic Biol Med.* 49, 1722-1734, 2010.
- 46) Xie, YC. Dong, XW. Wu, XM. Yan, XF. Xie, QM. Inhibitory effects of flavonoids extracted from licorice on lipopolysaccharide-induced acute pulmonary inflammation in mice. *Int Immunopharmacol.* 9, 194-200, 2009.
- 47) Zhu, L. Wei, H. Wu, Y. Yang, S. Xiao, L. Zhang, J. Peng, B. Licorice isoliquiritigenin suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis in vitro and prevents inflammatory bone loss in vivo. *Int J Biochem Cell Biol.* 44, 1139-1152, 2012.
- 48) Liu, Y. Xie, S. Wang, Y. Luo, K. Wang, Y. Cai, Y. Liquiritigenin inhibits tumor growth and vascularization in a mouse model of HeLa cells. *Molecules.* 17, 7206-7216, 2012.
- 49) Jayaprakasam, B. Doddaga, S. Wang, R. Holmes, D. Goldfarb, J. Li, XM. Licorice flavonoids inhibit eotaxin-1 secretion by human fetal lung fibroblasts in vitro. *J Agric Food Chem.* 57, 820-825, 2009.
- 50) Sun, YX. Tang, Y. Wu, AL. Liu, T. Dai, XL. Zheng, QS. Wang, ZB. Neuroprotective effect of liquiritin against focal cerebral ischemia/reperfusion in mice via its antioxidant and antiapoptosis

- properties. *J Asian Nat Prod Res.* 12, 1051-1060, 2010.
- 51) Chen, ZA. Wang, JL. Liu, RT. Ren, JP. Wen, LQ. Chen, XJ. Bian, GX. Liquiritin potentiate neurite outgrowth induced by nerve growth factor in PC12 cells. *Cy-totechnology.* 60, 125-132, 2009.