

|||||

総 説

|||||

センノサイドA、Bの免疫化学的測定法の開発について

森 永 紀, 宇 都 拓 洋, 正 山 征 洋

(長崎国際大学 薬学部 薬学科)

要 旨

センノサイドAおよびセンノサイドBは、大黄やセンナの主有効成分で瀉下作用をもつ。腸内細菌はセンノサイドをレインアンスロンに代謝し、レインアンスロンが下剤効果を発揮する。大黄やセンナの品質を管理するために、センノサイドA、Bの簡便な分析方法が必要である。モノクローナル抗体を用いたイムノアッセイは迅速、簡便かつ高感度であり、様々な医薬品成分の分析方法として重要である。著者らはこれまでに、天然由来の生理活性成分に対するモノクローナル抗体作製の一環として、センノサイドA、Bに対するモノクローナル抗体の作製を行ってきた。その応用として、以下に示すセンノサイドA、Bの免疫化学的測定法の開発を行ったので報告する。

1. ELISA 法やイムノクロマトグラフ法を用いたセンノサイドA、Bのアッセイ系の確立
2. センノサイドA、Bのイースタンプロッキング法の開発
3. 免疫組織染色による大黄切片中のセンノサイドAの分布

キーワード

センノサイドA及びB、大黄、センナ、免疫化学的測定法

はじめに

大黄(図1a)は、神農本草経に下薬として収載されており、古来より重要な生薬の一つとして位置づけられてきた。本生薬は、西洋医学においては単味で健胃、瀉下剤として用いるが、漢方医学においては多くの漢方方剤に配合されており、駆お血、瀉下、消炎、抗菌などを目的として、さらには向精神薬として用いられる。このように多くの生理活性をもつ大黄は、「一般用漢方処方の手引」に収載される210処方のうち28処方に配合されている重要な生薬の一つである。含有成分はセンノサイド、アロエエモジン、レインなどのアントラキノン類が主体をなし、タンニン、スチルベン、ナフトレン、フェニルブタノンなどのフェノール化合物も含まれる。なかでも大黄に最も多く含まれる成分はセンノサイドAおよびB(図2)であり、アラビア系の生薬で下剤として使用されるセンナ

葉の成分と同一のもので、ヒトの生体内では腸内細菌によってレインアンスロンに変化し、はじめて瀉下作用を発現する(図3)。レインアンスロンの瀉下作用は、下行結腸またはS字結腸のみに作用し、服用後数時間で通常の硬さの便を排泄し、その後は正常な排便が起こる。品質の優れた大黄は、腸管の蠕動運動が低下している際に用いる有効かつ理想的な便秘薬と考えられている。しかしながら収縮刺激は腸管ばかりか子宮筋肉まで及ぶので、妊婦には投与してはならない。一方、センナ(図1b)は漢方薬に用いられることはないが、センナ葉から単離・精製されたセンノサイドAおよびBは緩下剤のプルゼニド錠(センノサイドAおよびBを12mg配合)等の医薬品原料として汎用されている。最近日本ではセンナ茎を配合したサプリメントや健康茶が広く流行しており、また、アメリカ、ヨーロッパ、オーストラリアにおいて



図1 大黃 (a)、センナ (b)

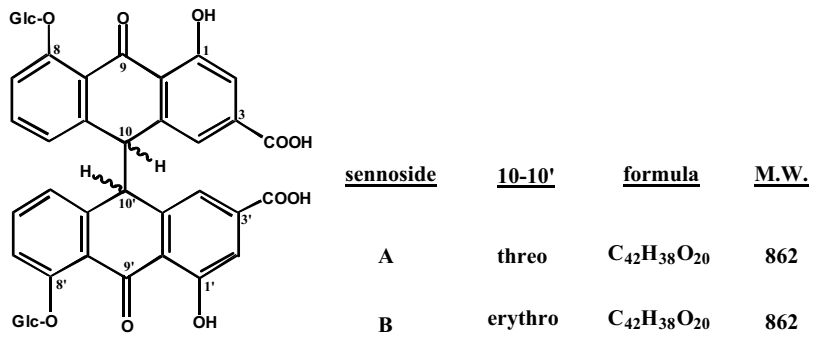


図2 センノサイドA、Bの構造式

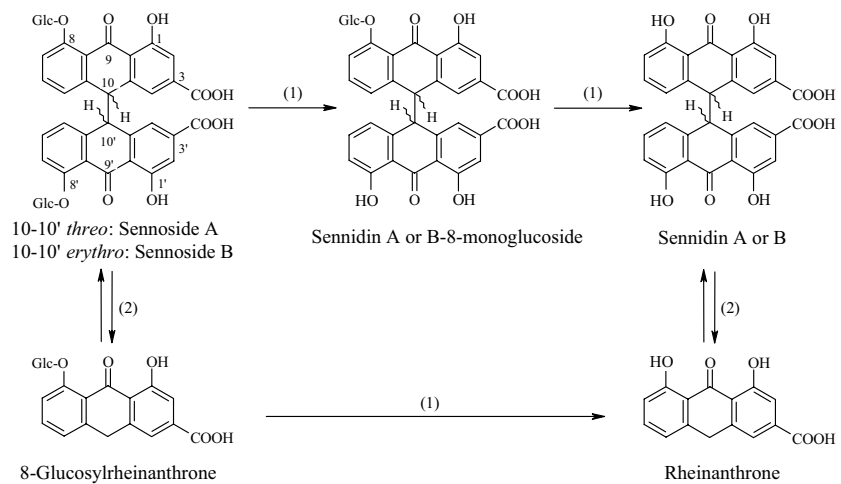


図3 ヒト腸内細菌によるセンノサイドA、Bの代謝

(1) : β -Glucosidase. (2) : NADH-dependent flavin reductase.

も血液循環や新陳代謝の増加を目的に健康食品やダイエット補助食品として広く用いられている。しかしながら、我が国で消費される大黃の90%以上が、また、センナに関しては全てを海外からの輸入に依存している現状であり、またこれらは産地による品質の変動も大きい。このため日本薬局方では品種とセンノサイド含量を規定している。大黃の品種は、*Rheum palmatum*, *R. tanguticum*, *R. officinale*, *R. coreanum* 又はそれらの種間雑種で、センノサイドAは0.25%以上と規定されている。センナの品種は、*Cassia angustifolia* と *C. acutifolia* の2種で総センノサイド(センノサイドA及びセンノサイドB)1.0%以上の用件が求められている。このため現在ではHPLC(高速液体クロマトグラフィ)によりセンノサイド含量を分析しているのが現状である¹⁻³⁾。

以上の通り多くの大黃やセンナが消費され、これに伴って膨大なサンプルのセンノサイド含量を分析する必要があるため、分析感度と分析精度の改善、分析時間の短縮、前処理(濃縮、分離、精製等)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センノサイドA、センノサイドBそれぞれに対する特異的なモノクローナル抗体を作製した⁴⁻⁶⁾。これらを用いた高感度分析法であるEnzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)法を確立した⁷⁻⁹⁾。また、大黃やセ

ンナに含まれる多数の成分の中からセンノサイドA及びセンノサイドBのみを発色出来る新しい検出法を見出し、イースタンプロットティングと命名した¹⁰⁾。さらに尿検査で用いるスティックタイプの簡易分析キットも開発してきた¹¹⁻¹²⁾。本稿では、医薬品、漢方薬、健康食品における大黃やセンナの位置付けを主有効成分センノサイドA及びBの分析という観点から紹介する。

1. 抗センノサイドA及びセンノサイドBモノクローナル抗体の作製

従来はウサギに抗原を注射して抗体を作製していたが、マウスを用いる方法を選んだ。しかし、センノサイドA及びBは分子量が862と小さくそのままでは抗原となり得ない。そこで図4に示す通りペプチド合成補助薬の1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)-carbodiimide HCl(EDC)を用いたカルボジイミド法により、センノサイドのカルボキシル基(カルボン酸)とウシ血清アルブミン(BSA)のリジン残基との間でペプチド結合を形成させ、免疫原であるセンノサイドA-BSAコンジュゲートを作製した。同様に、センノサイドB-BSAコンジュゲートも作製した。これらの免疫複合体中のセンノサイドの結合数をMALDI-tof MSで確かめた後、マウスへ注射し、抗体価が上昇した時点で、マウスの脾臓細胞を単離する。これとがん細胞の一種であるミエローマと呼ばれる細胞

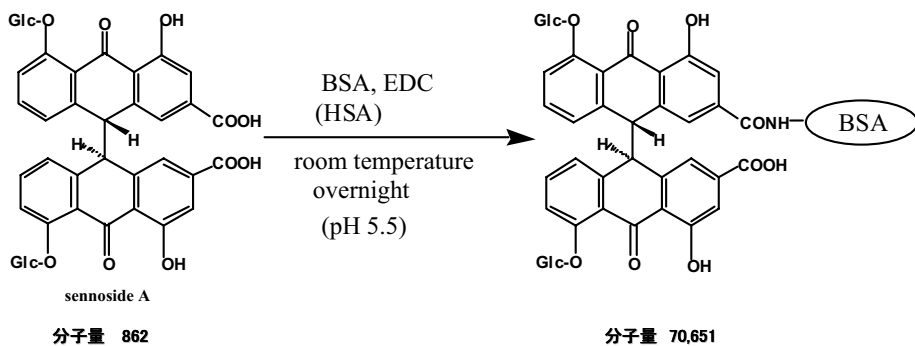


図4 センノサイドA-BSAコンジュゲートの調製

を融合して、抗センノサイドAモノクローナル抗体を産生する一つの細胞を選抜し、徐々に大量培養へ移行し、センノサイドAに対するモノクローナル抗体を多量に生産することに成功した(文献4)。センノサイドBに対するモノクローナル抗体も同様に多量生産に成功した⁵⁾。

2. 競合的 ELISA の確立

図5aはセンノサイドAの、図5bはセンノサイドBの検量線である。通常HPLCの検量線とは逆向きの右肩下がりの検量線となるが、センノサイドAにおいては、20~

200ng/mlの間で、センノサイドBにおいては、0.5~20ng/mlの間で信頼性の置ける分析が可能で、感度は概ねHPLCの数千倍程度である。

モノクローナル抗体で重要なことは多数の成分の中においてターゲットとする成分のみを簡便に分析出来る機能を持っていることである。各種アントラキノン類やフェノール類に対する交差反応性を競合的ELISAにより測定し、Zenkらの方法によりセンノサイドA及びセンノサイドBを100%としたときの交差反応性(クロスリアクション)を算出した。表1に示すようにセンノサイド以外の成分とは親和性が

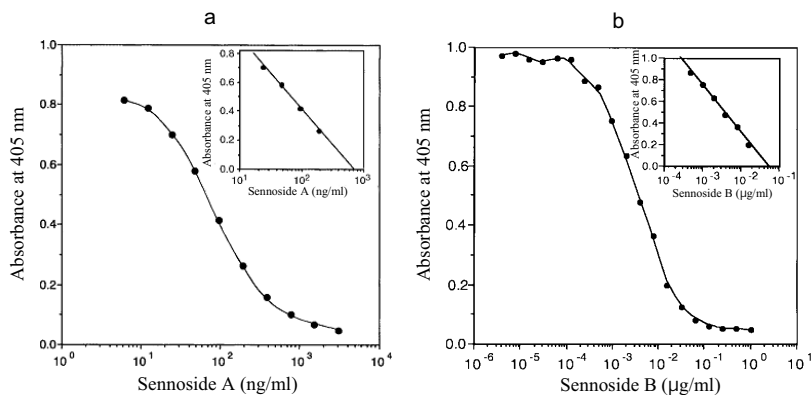


図5 競合的 ELISA によるセンノサイドA、Bの検量線

表1 抗センノサイドAモノクローナル抗体及び抗センノサイドBモノクローナル抗体の交差反応

Compound	Anti-SA Mab	Anti-SB Mab			
			<i>Anthraquinone</i>		
sennoiside A	100	2.45		10-10'	
sennoiside B	0.28	100		sennoiside A	threo
rhein	0.35	0.012		sennoiside B	erythro
emodin	< 0.04	< 0.004			
aloe-emodin	< 0.04	< 0.004			
barbaloin	< 0.04	< 0.004			
1,4-dihydroxy-anthraquinone	< 0.04	< 0.004			
			<i>Stilbene</i>		
rhaponticin	< 0.04	< 0.004		R ₁ R ₂	
			<i>Phenol carboxylic acid</i>		
gallic acid	< 0.04	< 0.006		rhein	COOH H
vanillic acid	< 0.04	< 0.006		emodin	CH ₃ OH
caffeic acid	< 0.04	< 0.006		aloe-emodin	CH ₂ OH H
homogentisic acid	< 0.04	< 0.006			

なく、従って選択性の高い分析が可能なのが明らかとなった。

3. イースタンブロットングの開発

ノーザン (RNA)、サザン (DNA)、ウエスタン (タンパク) に次いで4番目の検出法としてイースタンブロットングと命名したので紹介する。

大黄やセンナのサンプルを通常の薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて溶媒系で展開し、硫酸等で発色すると全ての化合物が発色するのでスタンダード無くしてはセンノサイドA及びセンノサイドBを特定することは不可能に近い。本法ではTLCで成分を展開し、化合物全てをTLCからPVDF膜に転写し、膜を前述のEDCで処理し、そこへBSA等を加えると複合体を形成し、同時に膜上へのセンノサイドの結合能を付与することになる。つまりBSA等のタンパクを介して膜にセンノサイドが結合することになる (図4参照)。この時点で抗センノサイドAモノクローナル抗体を加え抗原抗体反応を行い、酵素であるパーオキシダーゼを標識した2次抗体を加え、最後にパーオキシダーゼの基質を添加することにより、センノサイドA

のみのスポットが発色する (図6)。同様に、抗センノサイドBモノクローナル抗体を用いるとセンノサイドBのみが発色される。図7は、これらの抗体を使用したイースタンブロットングによるマメ科 *Cassia* 属植物中のセンノサイドA及びセンノサイドBの二重染色による分析である。

本イースタンブロットング法のもう一つの応用例をご紹介します。大黄の中のセンノサイドAの分布をビジュアル的に知ることは出来なかったが、大黄のスライス上にPVDF膜を重ねてセンノサイドを膜に吸着させ、イースタンブロットング法を適用すると図8のようにセンノサイドAの分布を容易に見ることが出来る。

4. 簡易分析キットの開発

大黄やセンナの育種を目的としたフィールド (生産現場) におけるセンノサイドA及びセンノサイドB含量の分析も必要になってくるであろう。本目的で簡易分析キットを開発した。

図9に示すように抗原・タンパク複合体を配置する。一番トップには全ての抗体をトラップ (捕獲) 出来るように抗マウスIgG抗体を配置

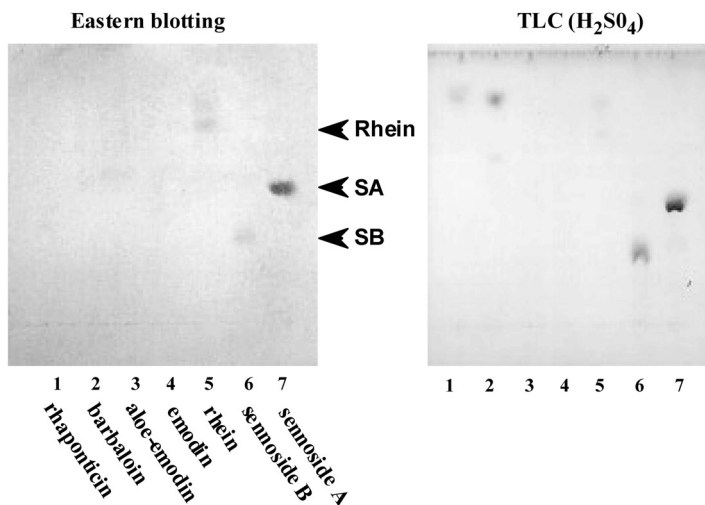


図6 センノサイドAのイースタンブロットング

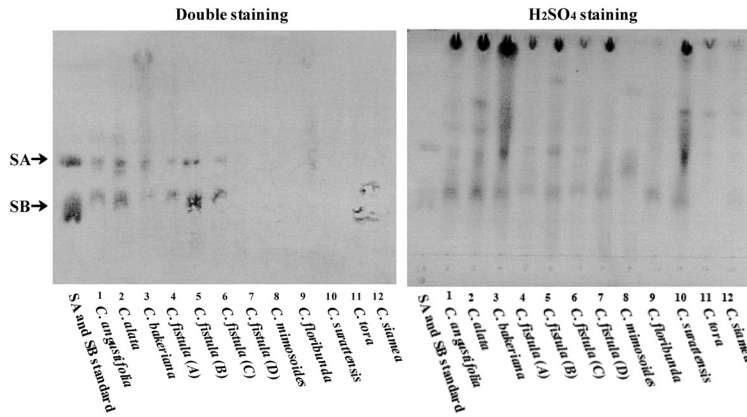
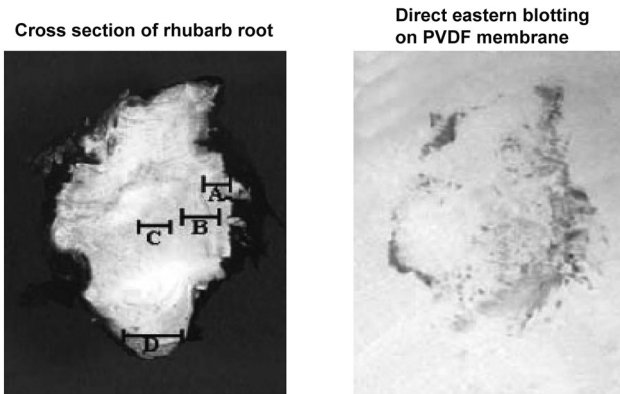


図7 マメ科 *Cassia* 属植物中のセンノサイドA、Bの二重染色



- A: Phloem (篩部)
- B: Radiate wood (放射状木部)
- C: Pith (髓)
- D: Bud (芽)

図8 抗体染色による大黄切片中のセンノサイドA

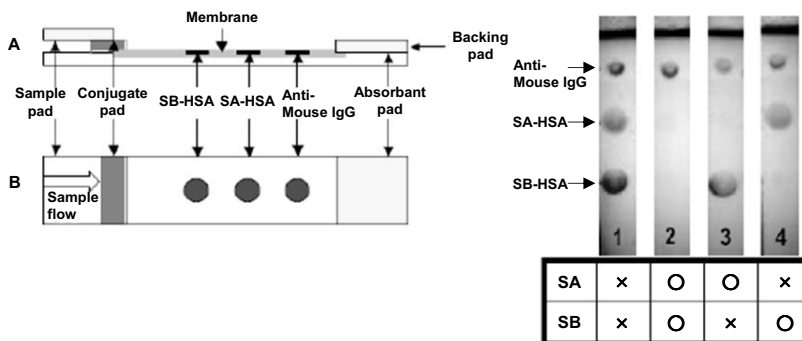


図9 センノサイドA、B簡易検出キット
左図はキットの模式図である。右図は実際の発色状況を示す。

した。大黄やセンナを含むサンプルと金粒子で標識した抗センノサイドAモノクローナル抗体及び抗センノサイドBモノクローナル抗体はサンプル中の溶媒により展開されていく。この中で抗原抗体反応が起こり、競合が起こる。余分の抗センノサイドAモノクローナル抗体及び抗センノサイドBモノクローナル抗体が残存すれば、センノサイドA-ヒト血清アルブミン(HSA)または、センノサイドB-HSA複合体でトラップされ、金粒子の赤い色が発色する仕組みである。本反応は競合法なので、発色すればセンノサイドA及びセンノサイドBは含まれないことになる。図9の右図は実際の発色状況を示す。1はセンノサイドA及びBを含有していない。2はセンノサイドA及びBを含有している。3はセンノサイドAのみを含有している。4はセンノサイドBのみを含有している。

また検出限界濃度は、センノサイドA、Bそれぞれに対して200ng/mlであり、分析時間も10分程度と迅速、簡便かつ高感度である。本簡易キットで分析した後に前述のELISAで分析し最終的な含量を決定する。フィールドにおい

て簡易分析キットで大雑把に分析し、比較的含有量が高いサンプルを選抜し、ELISAで分析し、目指す個体を選抜し、センノサイドA及びセンノサイドB高含有株を選抜育種することも可能と考えている。

5. 各種大黄、センナ植物中のセンノサイドA、Bの含量

各種大黄を簡便に品質評価するため、またセンノサイドの資源探索を目的として各種マメ科 *Cassia* 属植物の小葉エキス中のセンノサイドA、Bの含量を競合的ELISAにより測定した。その結果、表2に示すように信州大黄が最も高含量であり、雅黄も高含量であることが明らかとなった。信州大黄は、武田薬品が20年以上かけ、センノサイドA、Bの含有量が安定的に得られる品種として開発したもので、国内産「薬用大黄」第一号として、農林水産省に認められている。*Cassia* 属植物に関しては、局方センナである *Cassia angustifolia* が最もセンノサイドA、B含有量が多かった。また競合的ELISAによる定量値はHPLCによるものと近似しており、本法の信頼性も確認できる。

表2 各種大黄、センナ植物中のセンノサイドA、Bの含量

Sample	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mg}$ dry weight powder)							
	Sennoside A		Sennoside B		Total Sennosides			
	HPLC	%RSD ^a	HPLC	%RSD	HPLC	%RSD	ELISA	%RSD
Shinshu Daio	12.28 \pm 0.41	[3.34]	6.15 \pm 0.59	[9.59]	18.43 \pm 1.00	[5.43]	18.37 \pm 1.24	[6.75]
Ga-wo	6.93 \pm 0.02	[0.29]	3.80 \pm 0.16	[4.21]	10.73 \pm 0.18	[1.68]	7.89 \pm 0.37	[4.69]
Kinmon Daio	0.85 \pm 0.04	[4.71]	0.38 \pm 0.02	[5.26]	1.23 \pm 0.06	[4.88]	3.14 \pm 0.13	[4.14]
Itto-Ga-wo (A)	3.69 \pm 0.32	[8.67]	1.52 \pm 0.18	[11.84]	5.21 \pm 0.50	[9.60]	4.59 \pm 0.55	[11.98]
Itto-Ga-wo (B)	3.69 \pm 0.28	[7.58]	1.40 \pm 0.11	[7.86]	5.09 \pm 0.39	[7.66]	4.58 \pm 0.20	[4.37]
<i>Cassia angustifolia</i>	4.56 \pm 0.25	[5.48]	5.10 \pm 0.15	[2.94]	9.66 \pm 0.40	[4.14]	9.50 \pm 0.19	[2.00]
<i>C. alata</i>	1.19 \pm 0.12	[10.08]	1.16 \pm 0.15	[12.93]	2.35 \pm 0.27	[11.49]	2.33 \pm 0.13	[5.58]
<i>C. bakeriana</i>	0.40 \pm 0.03	[7.50]	0.44 \pm 0.02	[4.55]	0.84 \pm 0.05	[5.95]	0.88 \pm 0.05	[5.68]
<i>C. fistula</i> (A)	1.14 \pm 0.08	[7.02]	0.75 \pm 0.08	[10.67]	1.89 \pm 0.16	[8.47]	1.81 \pm 0.08	[4.42]
<i>C. fistula</i> (B)	2.04 \pm 0.32	[15.68]	1.52 \pm 0.12	[7.89]	3.56 \pm 0.44	[12.36]	3.45 \pm 0.16	[4.64]
<i>C. fistula</i> (C)	1.90 \pm 0.16	[8.42]	2.05 \pm 0.24	[11.71]	3.95 \pm 0.40	[10.13]	4.45 \pm 0.27	[6.07]
<i>C. fistula</i> (D)	0.10 \pm 0.01	[10.00]	0.13 \pm 0.00	[0.00]	0.23 \pm 0.01	[4.35]	0.27 \pm 0.02	[7.40]

Data are the means of triplicate assays \pm SD. ^aCoefficient of variation Relative Standard Deviation.

6. 各種漢方製剤、医薬品中のセンノサイド A、B の含量

各種漢方製剤の0.1%アンモニア-メタノールエキスを調整し、競合的 ELISA によりセンノサイドA、B含量を分析した。大黄甘草湯が最も高い含有量を示し、1包(2.5g)中にセンノサイドA、Bを2.9mg含むことになる(表3)。しかしながらELISAの定量結果が各処方における大黄の配合量を反映しているか否かを確認するには至らなかった。その理由としては本属の植物は交雑しやすいため多くの種間雑種を生じ、また市場では様々な名称で流通しているために、これらから製造された生薬の品質は不均一な場合が多く、それをを用いた漢方製剤の品質にも大きく影響するものと推察される。また各種漢方製剤は製造過程もそれぞれ異なっており、その間に加熱等の何らかの影響を受けることでセンノサイドが変化したためと考えられる。

一方、センナ葉から単離・精製されたセンノサイドAおよびBは医薬品である緩下剤のプルゼニド錠として汎用されている。本錠剤は1錠中にセンノサイドA、Bを12mg含むと記載されている。実際にELISAで測定したところ、センノサイドAを4.8mg、センノサイドBを7.2mgであった。西洋薬は作用が迅速、漢方薬は作用がマイルドと言われる所以が下剤効果の活性本体の配合量からも推察できる。大黄甘草

湯を1日3回服用すると8.7mgのセンノサイドA、Bを摂取することとなるが、西洋薬であるプルゼニド1錠中のセンノサイドA、B量は12mgであり、プルゼニドの下剤効果がある理由となる。

7. センナ茎配合健康茶中のセンノサイドA、Bの含量

健康食品においてはセンナ茎(番瀉茎)を配合したサプリメント錠や健康茶が多数販売されている。これらはダイエットをセールスポイントとしているが、実際にセンノサイドAおよびBを分析する限りでは、入手出来た全てのセンナ茎配合茶において、表4に示すようにセンノサイドが確認された。表4は健康茶1回分(1ティパック)に含まれる総センノサイドA、B量を示している。1度に飲む量や抽出時間にもよるが、これらを1日数回飲用すると1日のセンノサイド総摂取量がプルゼニド錠を服用する場合と同等に達する可能性もある。センナ茎は食品として使用可能な部位ではあるが、薬用部位である小葉や葉軸と同様にセンノサイドA、Bを含んでいる。センナ茎配合茶を飲用したために腹痛や下痢といった症状を訴えた消費者も多数存在する。「健康」という言葉に対して、安全・安心・無害というイメージを持つ人が多いが、これらを謳った食品の安易な服用により、深刻な健康被害が頻発しているため、商品の取

表3 各種漢方製剤、医薬品中のセンノサイドA、Bの含量

Sample	Content (µg/mg powder)		Comparison of rhu barb (%)
	Sennoside A	Sennoside B	
大黄甘草湯	0.82 ± 0.00	0.32 ± 0.02	66.7
茵陳蒿湯	0.26 ± 0.02	(7.56 ± 0.29) × 10 ⁻²	12.5
桂枝加芍薬大黄湯	0.38 ± 0.02	0.11 ± 0.02	10.5
大柴胡湯	(9.70 ± 0.57) × 10 ⁻²	(2.40 ± 0.26) × 10 ⁻²	4.3
乙字湯	(6.79 ± 0.29) × 10 ⁻²	(2.06 ± 0.21) × 10 ⁻²	2.9
桔梗湯	0	0	0
四君子湯	0	0	0
プルゼニド (1 錠中)	4.81 ± 0.13 (mg)	7.18 ± 0.19 (mg)	

表4 センナ茎配合健康茶中のセンノサイドA、Bの含量

Sample	Content (mg/a dose)		
	Sennoside A	Sennoside B	Total sennosides
1	3.05 ± 0.41	3.95 ± 0.98	7.00 ± 1.39
2	3.36 ± 0.24	3.22 ± 0.30	6.58 ± 0.54
3	2.79 ± 0.43	2.53 ± 0.18	5.32 ± 0.61
4	1.35 ± 0.25	1.81 ± 0.16	3.16 ± 0.41
5	1.41 ± 0.11	1.26 ± 0.16	2.67 ± 0.27
6	1.01 ± 0.19	1.14 ± 0.04	2.15 ± 0.23
7	0.66 ± 0.07	0.62 ± 0.04	1.28 ± 0.11
8	0.53 ± 0.03	0.57 ± 0.04	1.10 ± 0.07
9	0.28 ± 0.02	0.44 ± 0.04	0.72 ± 0.06

り扱いには注意を要する。

おわりに

近年、慢性病や生活習慣病の患者が増加する中で、漢方薬の需要が増加の途にある。また、医学教育に漢方医学が平成14年からコアカリキュラムに組み込まれ、臨床医療に漢方を取り入れる医師が今後増えていくものと推察される。このような状況の中で、漢方薬の効き目を担保するのは配合される生薬の品質にかかっており、品質評価が重要な部分になっている。

本稿では古くから下剤として用いられている大黄、センナについて、それらの有効成分であるセンノサイドA、Bから概説した。一般に大黄とよばれるものはタデ科 *Rheum* 属植物であり、センナはマメ科 *Cassia* 属植物であるが、見た目や名前から品質を見分けることは難しい。そこで著者らはセンノサイドA及びセンノサイドBに対するモノクローナル抗体を作製し、競合的ELISAをはじめ、イースタンブロットィング、イムノクロマトグラフ法を利用した簡易分析キットの開発を行った。これらのアッセイ系は、各種大黄、センナ植物のみならず、大黄配合の漢方製剤、医薬品の錠剤、さらにはセンナ茎配合の健康食品中のセンノサイドA、Bを迅速、簡便かつ高感度に分析できる新規の手法である。モノクローナル抗体を用いたELISA法が将来的には日本薬局方の定量分析法に掲

載されることを期待しているが、より安価にELISAキットを提供するための研究もスタートしている。

今後はモノクローナル抗体の研究の進化につとめるべく小型化抗体の作製、ノックアウト漢方の調製から創薬・育薬研究を遂行したいと念じている。

謝 辞

本研究は九州大学大学院薬学研究院で行われたもので、田中宏幸准教授に深くお礼申し上げます。本研究の一部は日本学術振興会アジアコアプログラムの助成による。合わせて深謝致します。

参考文献

- 1) Koyama, J., Morita, I., Fujiyoshi, H., Kobayashi, N. (2005) ' Simultaneous determination of anthraquinones, their 8- -D- glucosides, and sennosides of rhei rhizome by capillary electrophoresis.' *Chem. Pharm. Bull* PP. 573-575.
- 2) Li, C. Y., Chiu, C. H., Huang, H. S., Lin, C. H., Wu, T. S. (2006) ' High-performance liquid chromatographic method for simultaneous quantification of eight major biologically active ingredients in Da-Chai-Hu-Tang preparation.' *Biomed. Chromatogr.* 20, PP. 305-308.

- 3) Koyama, J., Morita, I. Kobayashi, N. (2007) ' Simultaneous determination of anthraquinones in rhubarb by high – performance liquid chromatography and capillary electrophoresis.' *Journal of Chromatography A* 1145, PP. 183–189.
- 4) Morinaga, O., Tanaka, H., Shoyama, Y. (2000) ' Production of monoclonal antibody against a major purgative component, sennoside A, its characterization and ELISA.' *Analyst* 125, PP. 1109–1113.
- 5) Morinaga, O., Nakajima, S., Tanaka, H., Shoyama, Y.(2001) ' Production of monoclonal antibodies against a major purgative component, sennoside B, their characterization and use in ELISA.' *Analyst* 126, PP. 1372–1376.
- 6) 森永 紀, 田中宏幸, 正山征洋 (2002) 「抗センノサイドBモノクローナル抗体」特開2002–065258 .
- 7) Shan, S. J., Putalun, W., Fukuda, N., Morinaga, O., Tanaka, H., Shoyama, Y. (2000) ' ELISA, Western blotting, immunocytochemical localization and immunoaffinity column for naturally occurring bioactive compounds using monoclonal antibodies.' *Journal of Food and Drug Analysis* 8, PP. 258–269.
- 8) Morinaga, O., Putalun, W., Fukuda, N., Shan, S. J., Kanetsuki, Y., Tanaka, H., Shoyama, Y.(2001) ' Development of analytical system for pharmacologically active compounds using monoclonal antibodies. ' *Current Topics in Analytical Chemistry* 2, PP. 147–158.
- 9) Morinaga, O., Uto, T., Sakamoto, S., Tanaka, H., Shoyama, Y. (2009) ' Enzyme – linked immunosorbent assay for total sennosides using anti–sennoside A and anti–sennoside B monoclonal antibodies.' *Fitoterapia* 80, PP. 28–31.
- 10) Morinaga, O., Uto, T., Sakamoto, S., Putalun, W., Lhieochaiphant, S., Tanaka, H., Shoyama, Y. (2009) ' Development of eastern blotting technique for sennoside A and sennoside B using anti – sennoside A and anti – sennoside B monoclonal antibodies.' *Phytochem. Anal.* in Press.
- 11) Waraporn Putalun, 森永 紀, 田中宏幸, 正山征洋, Sorasak Lhieochaiphant (2004) 「免疫化学的手法による sennoside 迅速分析キットの開発」『日本植物園協会誌』第38号, 108–112頁 .
- 12) Putalun, W., Morinaga, O., Tanaka, H., Shoyama, Y.(2004) Development of a one–step immunochromatographic strip test for the detection of sennosides A and B.' *Phytochem. Anal.* 15, PP. 112–116.