

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-65258

(P2002-65258A)

(43)公開日 平成14年3月5日(2002.3.5)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/02		C 0 7 K 16/16	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/16		C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10		G 0 1 N 33/53	S 4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/08		33/577	B 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/53		C 1 2 N 15/00	C
審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 8 数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000-258338(P2000-258338)

(22)出願日 平成12年8月29日(2000.8.29)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成12年8月8日 日本生薬学会発行の「日本生薬学会第47回(2000年) 年会講演要旨集」に発表

(71)出願人 800000035

株式会社産学連携機構九州

福岡県福岡市東区箱崎6丁目10番1号

(72)発明者 正山 征洋

福岡県福岡市東区馬出3-1-1 九州大学薬学部内

(72)発明者 田中 宏幸

福岡県福岡市東区馬出3-1-1 九州大学薬学部内

(74)代理人 100087675

弁理士 筒井 知

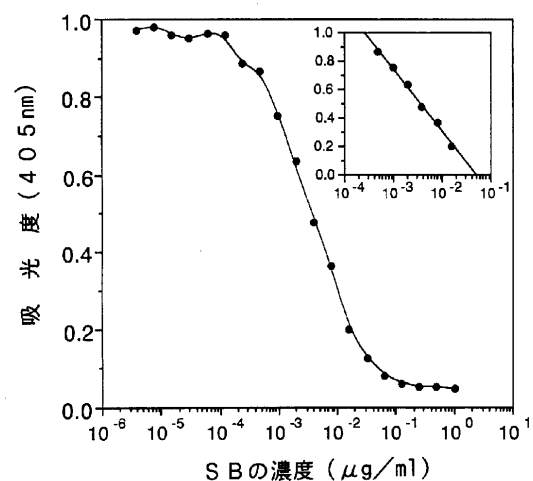
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗センノサイドBモノクローナル抗体

(57)【要約】

【課題】 大黃などの薬用植物に含有される主要な配糖体であるセンノサイドB (S B) の簡便な分析手段を提供する。

【解決手段】 I g G 2 bまたはI g G 1のサブクラスに属しκ軽鎖を保有しS Bに対して特異的に反応するモノクローナル抗体。E D Cの存在下にS Bとウシまたはヒトの血清アルブミンを反応させて得られたS B-血清アルブミン複合体で免疫された動物(好ましくはマウス)の抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを融合させて得られたハイブリドーマを選択培養し、S Bに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングおよびクローニングすることによって作製される。このモノクローナル抗体をE L I S A法等の免疫測定法に適用することによりS Bを簡便且つ高感度に定量することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 センノサイド B に対するモノクローナル抗体。

【請求項 2】 IgG1 のサブクラスに属し、κ 軽鎖を保有することを特徴とする請求項 1 のセンノサイド B に対するモノクローナル抗体。

【請求項 3】 IgG2b のサブクラスに属し、κ 軽鎖を保有することを特徴とする請求項 1 のセンノサイド B に対するモノクローナル抗体。

【請求項 4】 請求項 1～請求項 3 のいずれかのセンノ 10
サイド B に対するモノクローナル抗体を作製する方法であって、N-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドの存在下にセンノサイド B とウシまたはヒトの血清アルブミンとを反応させることによりセンノサイド B のカルボキシル基と血清アルブミンのリジン残基とを結合させたセンノサイド B-血清アルブミン複合体で免疫された動物の抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを融合させて得られたハイブリドーマを選択培養し、センノサイド B に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングおよびクローニングす 20
る工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 5】 抗体産生細胞としてマウスのひ細胞、骨髓腫細胞としてマウスの骨髓腫細胞を用いることを特徴とする請求項 4 のモノクローナル抗体の作製方法。

【請求項 6】 請求項 1～請求項 3 のいずれかのセンノ 30
サイド B に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、モノクローナル抗 30
体の技術分野に属し、特に、薬用植物に含有される配糖体の 1 種であるセンノサイド B に対するモノクローナル抗体に関する。

【0002】

【従来の技術とその課題】センノサイド B（センノシド B：以下、SB と略称することがある）は、大黃（Rhei Rhizoma）やセンナ（Sennae Folium）のような薬用植物に微量含有されるアントラキノン構造を持つ配糖体である。

【0003】SB は腸内細菌により変化を受けて強い瀉 40
下作用を示すことが知られている。センノシド B 等の体内動態を解析したり、生薬の品質評価を行なうには SB をマーカー物質として高精度に分析することが必要である。また、近年瘦身茶等にセンナを配合した違法な健康茶が市場に出回っており、これらの製品を検査するためにも大量のサンプルに対処できる簡便な分析法の出現が望まれている。しかしながら、これらの要求に十分適うような簡便且つ高感度の SB の分析手段は未だ確立されて 50
いない。すなわち、従来、SB のような配糖体の分析には専ら HPLC（高性能液体クロマトグラフィー）の

ような手段が用いられていた。しかしながら、従来の HPLC 等による分析においては、前処理（予備的精製）が必要であったり、一検体の分析時間が長い等の欠点があった。

【0004】一方、細胞融合技術は、ケーラーとミルスタインの報告（Nature, 495-497 頁、1975 年）以来急速に発展した。特定の抗原で免疫した哺乳動物のひ細胞（脾細胞）と癌細胞である骨髓腫細胞（ミエローマ細胞）を融合させた雑種細胞（ハイブリドーマ）は、用いたひ細胞による特定抗原に対する抗体産生能を有することから、これを利用して多くのタンパク質やペプチドのような高分子化合物に対して特異的な抗体、すなわちモノクローナル抗体（以下、MAb と表記することがある）を産生させ、この MAb を用いてそれらのタンパク質等のアッセイ系を構築することが試みられてきた。しかし、SB は低分子のため通常は抗原となり得ず、事実、SB は薬用としてヒトに供されてきたことから抗原性を有するとは考えられていなかったため、SB に対する MAb は知られていなかった。

【0005】

【課題を解決するための手段】このたび本発明者は、特定の処理を施した SB で動物を免疫し、細胞融合により SB に対する MAb を産生するハイブリドーマを得、このハイブリドーマから抗 SB MAb を大量に生産することに成功し、本発明を導き出した。

【0006】かくして、本発明は、初めて、SB に対するモノクローナル抗体を提供するものである。さらに、本発明に従えば、そのような SB に対するモノクローナル抗体の具体例として、IgG1 または IgG2b のサブクラスに属し、κ 軽鎖を保有するモノクローナル抗体が提供される。

【0007】本発明は、さらに、上記のごとき抗 SB モノクローナル抗体を作製する方法を提供し、本発明の方法は、N-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドの存在下にセンノサイド B とウシまたはヒトの血清アルブミンとを反応させることによりセンノサイド B のカルボキシル基と血清アルブミンのリジン残基とを結合させたセンノサイド B-血清アルブミン複合体で免疫された動物の抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを融合させて得られたハイブリドーマを選択培養し、センノサイド B に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングおよびクローニングする工程を含む。本発明に従う抗 SB モノクローナル抗体の作製方法の好ましい態様においては、抗体産生細胞としてマウスのひ細胞、骨髓腫細胞としてマウスの骨髓腫細胞を用いる。さらに、本発明は、上記の抗 SB モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマも提供する。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明の抗 SB MAb は、これまでに案出された細胞融合技術とモノクローナル抗体作

製法を工夫し適用することにより作製することができる。すなわち、

(1) 抗原としてSBと血清アルブミンの複合体で免疫した動物の抗体産生細胞を調製する。(2) 骨髓腫細胞(ミエローマ細胞)を培養増殖し、調製する。(3) 上記2種の細胞をポリエチレングリコールのような融合促進剤を媒体として融合する。(4) 得られたハイブリドーマをHAT培地のような選択培地にて培養(増殖)する。(5) 抗SB MA b産生ハイブリドーマをスクリーニング(選抜)する。(6) 選抜されたハイブリドーマをクローニングする。(7) 得られたハイブリドーマをインビトロまたは動物腹腔内で培養(増殖)して抗SB MA bを得る。以下、各工程について詳細に説明する。

【0009】(1) 抗体産生細胞の調製

SBとウシ血清アルブミン(BSA)またはヒト血清アルブミン(HSA)との複合体(抱合体:コンジュゲート)で動物を免疫する。このSB-BSA複合体またはSB-HSA複合体は、EDC [N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド]を用いるカルボジイミド法により得ることができる。すなわち、弱酸性(pH5.5)に調整した溶液中で、EDCの存在下にSBとBSA(またはHSA)とを室温で反応させることにより、SBのカルボキシル基とBSA(またはHSA)のリジン残基とがペプチド結合したSB-BSA(またはSB-HSA)複合体が得られる。図1は、このような複合体が得られる反応を模式的に示すものである。本発明においては、マルディトフ(MALDI-tof)スペクトル測定により、BSAまたはHSAの1分子当たり1~5分子のSBが結合されていることを確認したSB-BSA(またはHSA)複合体を用いる。

【0010】免疫法としてはフロイントの完全アジュバントを併用する手法がとられる。免疫される動物としてはマウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジなどが例示される。抗体産生細胞としては脾臓、リンパ節、末梢血液等から分離した細胞が使用される。

【0011】(2) 骨髓腫細胞の調製

細胞融合に使用する骨髓腫細胞は特に限定されず、各種の哺乳動物の細胞株が利用可能であるが、抗体産生細胞の調製に用いた動物と同種の細胞株を使用するのが好ましい。本発明の抗SB MA bを作製するのに特に好ましい組み合わせはマウスのヒ細胞/マウスの骨髓腫細胞である。

【0012】用いる細胞株は細胞融合の後に、未融合の骨髓腫細胞が選択培地で生存できず、ハイブリドーマのみが増殖可能なようにすることによって、未融合細胞と融合細胞を選別することを考慮して、特定の薬剤抵抗性を有するものが好ましい。例えば8-アザグアニン抵抗性の細胞は、HAT培地中で生育できない性質を有する

ため好んで用いられる。具体的には、マウス骨髓腫細胞株、PAI、P3-X63-Ag8、P3-X63-Ag8-UI、P3-NSI/1-Ag4-1、X63-Ag8-6.5.3、SP2/0-Ag14、FO、S194/5XXO、BU.1、MPC11-45.6.、TG.1.7等が用いられる。

【0013】(3) 融合細胞

細胞融合は通常MEM培地、RMI1640培地、IMDM培地等のe-RDF培地中で、骨髓腫細胞と抗体産生細胞を融合促進剤の存在下に混合(混合比は通常1:4~1:10)することにより行なわれる。好ましい融合促進剤として平均分子量1000~6000のポリエチレングリコール(PEG)が使用できる。PEGの使用濃度は通常30~50%である。

【0014】(4) ハイブリドーマの選択培養

融合を終えた細胞は、10%FCS含有e-RDF培地などで適当に希釈し、遠心分離する。沈査を選択培地(例えばHAT培地)で浮遊し、96穴ウエルマイクロプレートに接種した後に、5%炭酸ガス培養装置で培養する。選択培地で生育してくる細胞がハイブリドーマである。

【0015】(5) 抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング

抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングは常法に従えばよく、特に限定されない。例えばハイブリドーマの増殖した培養液を採取し、SB-HSA(またはBSA)と反応させ、酵素、蛍光物質、発光物質などでラベルした2次抗体と反応させるELISA法により目的の抗SB抗体産生能を有するハイブリドーマを選抜する。

【0016】(6) ハイブリドーマのクローニング

抗体産生ハイブリドーマを含むことを確認した培養ウエル中の細胞を限界希釈法などによりクローニングを行ない、抗SB MA b産生ハイブリドーマを得る。

【0017】(7) 抗SB MA bの調製

上記のようにして得られたハイブリドーマを無血清培地のような適切な培地中でインビトロ培養することにより、その培養上清から目的の抗SB MA bが得られる。MA bを大量に生産する場合には骨髓腫細胞由来動物と同種の動物にプリスタン等の鉱物油を腹腔内投与後、ハイブリドーマを接種する。接種後、腹水を採取し、通常の抗体分離操作により抗SB MA bを得る。

【0018】抗SB MA bのキャラクタリゼーション

取得した抗SB MA bの免疫グロブリンクラスの同定や軽鎖の特性などは通常の方法(例えば、オクタロニー法)で決定する。また、抗SB MA bの分子量は、例えば、シナピン酸をマトリックスとするマルディトフ(MALDI-tof)マスマスペクトル測定から知ることができる。以下に本発明の特徴をさらに具体的に明らかにするため実施例を示すが、本発明はこれらの実施例によって制限されるものではない。

【0019】

【実施例】実施例1：抗SB MA bの作製

(1) 抗原の調製：SB（和光純薬より入手）6mgをTHF-20mMリン酸塩系緩衝液（pH5.5）

（7：3、1ml）に溶解し、BSA（Pierce社より入手）6mgを溶解した20mMのリン酸塩系緩衝液（pH5.5、0.3ml）を滴下し、さらに、EDC（和光純薬より入手）6mgを溶解した20mMのリン酸塩系緩衝液（pH5.5、0.3ml）を滴下して、室温で14時間攪拌した。反応後、水に対して4℃で透析を行ない、凍結乾燥してSB-BSA（5.5mg）を得た。なお、後述のELISAで使用するSB-HSA複合体も同様な方法で作製した。

【0020】(2) 抗原中のハプテン数の検討：得られたSB-BSA複合体の微量をとり、過剰のシナピン酸を添加して混合し、この混合物の少量をカセットのウェルに入れ、マルディトフマスにて測定した。そのスペクトラムを図2に示す。図2からBSA1分子に対して3分子のSBが結合していることを確認した。

【0021】(3) 免疫細胞の調製：SB-BSA複合体50μgをフロイントの完全アジュバントに乳濁化させ、BALB/C系マウスの腹腔内に投与した。以後、2週間の間隔で50μgのSB-BSA複合体アジュバント溶液を2回同様に投与し、最後にSB-BSA複合体のみを100μg投与し免疫を完了した。3日後にマウスを麻酔下屠殺し、脾臓を摘出した。脾臓を細断した後、100メッシュのナイロン網でろ過し、脾臓の単離細胞を得た。

【0022】(4) ハイブリドーマの調製：単離した免疫細胞に低張液（155mM塩化アンモニウム）を加えて赤血球を溶出した後、e-RDF培地で細胞を3回洗浄した。マウス骨髓腫細胞（本発明者の研究室で培養）もe-RDF培地で3回洗浄した。両細胞数を計測し細胞と骨髓腫細胞を10：1の割合として遠心分離に供した。上清を捨て、沈殿した細胞を充分解きほぐし、ポリエチレングリコール（PEG）4,000を培地で希釈した50%液を1.0ml滴下して融合を行なった。37℃、30秒間静置した後、e-RDF培地5mlを5分間かけて添加した。1,000rpmで10分間遠心した。沈殿を10%FCS添加IMDMにより洗い、遠心して上清を捨てた。ヒポキサンチン 10^{-2} M、アミノプテリン 4×10^{-7} Mおよびチミジン 1.5×10^{-5} Mを加えた（HAT）10%FCS添加e-RDF培地を用いて沈殿を再び浮遊させ、96ウェルマイクロプレートに100μlずつ分注した。3日毎に同一培地を50μl追加し、細胞の増殖を確認した。

【0023】(5) 抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング：ハイブリドーマが増殖したウェルの液を採取し、SB-HSA複合体を結合させた別のウェルに添加し、直接的ELISAによりSBに対するMA b産生ハ

イブリドーマのスクリーニングを行なった。即ち、96ウェルマイクロプレートにSB-HSA複合体0.1μg/100μl/ウェルを分注し、37℃で1時間インキュベートしてウェルに吸着させた。このウェルに培養上清を100μlずつ分注し抗原抗体反応を行なった。0.05%Tween20含有リン酸緩衝食塩水（T-PBS）で3回洗浄した。パーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体（2次抗体）1000倍希釈液をウェルあたり100μl添加し、1時間後にT-PBSで洗浄した。0.003%過酸化水素、ABTS〔2,2'-アジノービス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）〕0.3mg/ml含有クエン酸緩衝液を添加して発色させた。20分後プレートリーダーを用いて405nmの波長で吸光度を測定した。発色したウェルの細胞を採取した。

【0024】(6) 抗SB MA b産生ハイブリドーマのクローニング：抗体産生ハイブリドーマを限界希釈してウェルに分注した。抗体産生能を持ち、かつ増殖したハイブリドーマを同様に3回クローニングして所望のクローン、すなわち、SBに対するMA bを産生するハイブリドーマ5C7、5G6および7H12を得た。

【0025】(7) 抗SB MA bの調製：上記の産生ハイブリドーマ5C7、5G6および7H12のそれぞれを無血清培地（100μg/mlインスリン、35μg/mlトランスフェリン、20μMエタノールアミン、25nMセレンウム添加eRDF培地）で37℃、炭酸ガス培養器で培養した。上清をトリス緩衝液でpH7に調整して、プロテインGアフィニティカラムを用いて精製した。カラムを10mMリン酸緩衝液で洗浄後、吸着している抗体を100mMクエン酸緩衝液で溶出する。得られた抗体溶液は水に対して4回透析し、最後に凍結乾燥して精製した抗SBモノクローナル抗体（MA b-5C7、MA b-5G6およびMA b-7H12）を得た。

【0026】(8) MA bの免疫グロブリンクラスと分子量：精製したMA b-5C7、MA b-5G6およびMA b-7H12についてオクタロニー法により免疫グロブリンクラスを調べたところ、MA b-5C7はIgG2bのサブクラスに属し、MA b-5G6およびMA b-7H12はIgG1のサブクラスに属し、また、MA b-5C7、MA b-5G6およびMA b-7H12のいずれもκ軽鎖を保有するものであることが示された。

【0027】また、精製したMA b-5C7、MA b-5G6またはMA b-7H12にシナピン酸を混合してマルディトフマス（日本電子（株）製）により、純度を確認するとともに分子量を調べたところ、いずれも、約151,400であった。図3にMA b-7H12について測定したマルディトフマスペクトルグラムを示す。

【0028】実施例2：競合的ELISAによる定量試

験

実施例1で作製した抗SBモノクローナル抗体(MAb-7H12)の性能を調べるため以下のように競合的ELISA法による定量試験を行った。SB-HSA複合体溶液(1μg/ml)を100μlずつウエルに添加し1時間反応し吸着させる。非特異的結合を除去するためにスキนมilk添加PBS溶液300μlを加え1時間反応してブロッキングする。50μlの各種濃度の試験溶液を加え、さらに抗SB MAb溶液(1μg/ml)50μlを添加して1時間インキュベートした。T-10PBSで3回洗浄し、1000倍希釈したパーオキシダーゼ標識抗マウス抗体100μlを加え1時間反応した。1時間後にT-10PBSで洗浄した。0.003%過酸化水素、ABTS0.3mg/ml含有クエン酸緩衝液を添加して発色させた。15分後に405nmにおける発色を測定した。各濃度のSBの吸光度から検量線を作成した。その結果を図4に示す。図4に示されるように、SBの濃度は、 $10^{-4} \sim 10^{-1} \mu\text{g/ml}$ の濃度範囲において吸光度と良い相関を有し、この抗SB MAbがSBに対する優れた定量手段を提供することが理解される。

【0029】実施例3：交差反応性試験

実施例で作製した抗SBモノクローナル抗体(MAb-

7H12)の特異性を確かめるために、SBおよびアントラキノン類の大黃固有のフェノール配糖体、ならびにその他のフェノール類に対する交差反応性を調べた。交差反応性試験の方法は、大略、次のとおりである：各化合物(1mg)を正確に秤り10mMの炭酸水素ナトリウム溶液(pH8.3)(1ml)に懸濁し10分間超音波処理した。上清を10mMの炭酸水素ナトリウム溶液で希釈し各種濃度の検液を調製した。検液およびスタンダードであるSB溶液を50μl/ウエルずつイムノプレートに分注し1時間インキュベートした。プレートをブロッキング後、一次抗体溶液50μl〔MAb-7H12(0.1μg/ml)〕を加え、1時間インキュベートした。次に、二次抗体溶液を加え1時間インキュベートした後、基質溶液を加え発色強度を測定した。交差反応性CRは、下記の式により算出した：

$$CR(\%) = \left[\frac{(A/A_0 = 0.5 \text{ となる SB の 濃 度})}{(A/A_0 = 0.5 \text{ となる 検 液 の 濃 度})} \right] \times 100$$
ここで、Aはサンプルの吸光度、A₀は10mM炭酸水素ナトリウム溶液の吸光度を表わす。その結果を表1に示す。

【0030】

【表1】

化 合 物	MAb-7H12
<u>アントラキノン</u>	
sennoside B センノサイドB	100
sennoside A センノサイドA	2.45
rhein レイン	0.012
emodin エモディン	<0.004
aloe-emodin アロエーエモディン	<0.004
barbaloin バルバロイン	<0.004
1,4-dihydroxy-anthraquinone 1,4-ジヒドロキシアントラキノン	<0.004
<u>スチルベン</u>	
rhaponticin ラポンチシン	<0.004
<u>フェノール酸</u>	
gallie acid 没食子酸	<0.006
vanillic acid バニリン酸	<0.006
caffeic acid カフェイン酸	<0.006
homogentisic acid ホモゲンチジン酸	<0.006
<u>クマリン</u>	
esculin エスクリン	<0.006
<u>タンニン</u>	
Cinnamtannin B1 シンナムタンニンB1	<0.006
<u>フラボノイド</u>	
baicalin バイカリン	<0.006
naringin hydrate 水和ナリンジン	<0.006
wogonine ウオゴニン	<0.006
wogonin 7-O- β -glucuronide ウオゴニン-7-O- β -グルクロニド	<0.006
<u>クルクミノイド</u>	
curcumin クルクミン	<0.006
<u>カンナビノイド</u>	
Δ^1 -THCA	<0.006
Δ^1 -THC	<0.006

【0031】表1に見られるように、本発明に従うモノクローナル抗体MAb-7H12は、SBに特異的に親和性を有するモノクローナル抗体であることが明らかとなり、その他の化合物には殆ど交差反応性を示さなかった。

【0032】実施例4：各種大黃のSB含有量測定

実施例1で作製したMAb-7H12を用いる競合的ELISA法により各種大黃中のSB含有量を測定した。測定は、各種大黃の乾燥粉末30mgを0.1%アンモニアメタノール0.5mlで5回抽出し、抽出液を合わせて遠心分離に供し、その上清を10%mMの炭酸水素ナトリウム溶液で適切な濃度に希釈して実施例2に準

じて定量することにより行なった。

【0033】その結果を表2に示す。表2には、比較のために行なった従来のHPLC〔カラム：Cosmosil 5C18-ARII (4.5×150mm)、Nakalai Tesque製〕による結果も示している。表2に示されるように、本発明のモノクローナル抗体を用いるELISA法は、大黃中に微量含有されているSBを確実に検出することができ、従来から知られたHPLC法とも良い相関（相関係数0.987）があることが確認された。

【0034】

【表2】

サンプル	S B含有量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 乾燥重量)	
	ELISA	HPLC
信州大黃	6.01 ± 0.18	6.15 ± 0.59
雅黄	3.14 ± 0.27	3.80 ± 0.16
錦紋大黃	0.35 ± 0.01	0.38 ± 0.02
1等雅黄(細末)	1.44 ± 0.12	1.52 ± 0.18
1等雅黄(目欠)	1.42 ± 0.07	1.40 ± 0.11

【発明の効果】以上の説明から明らかなように、本発明は、大黃などの薬用植物に含まれる主要な配糖体であるS Bに対してきわめて特異性の高いモノクローナル抗体を提供する。この本発明の抗S Bモノクローナル抗体をELISA法等の通常の免疫測定法に適用すれば、前処理が不要な簡便且つ高感度で再現性の優れたS Bの分析が可能となり、各種の大黃およびその他の植物、それらの諸器官、各種の漢方製剤や嗜好製品等に含有されるS Bを定量することによりそれらの薬理学的品質評価に資することができる。

【図面の簡単な説明】

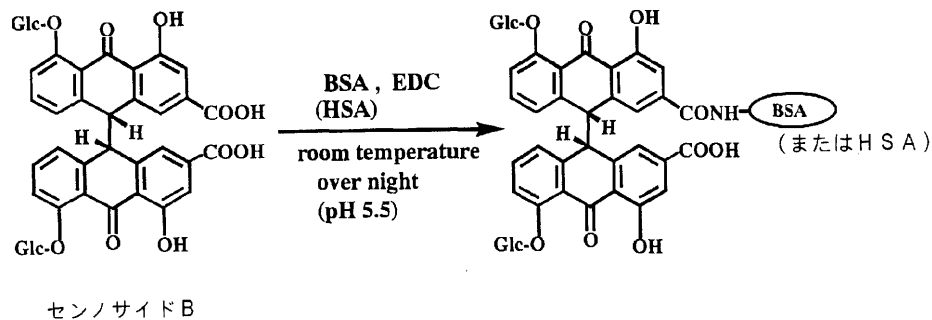
*【図1】本発明の抗S Bモノクローナル抗体を作製するのに用いられるS B-BSA（またはHSA）複合体が形成される反応を模式的に示す。

【図2】S B-BSA複合体の形成を確認するために測定したマルディットフマスのスペクトラムの1例である。

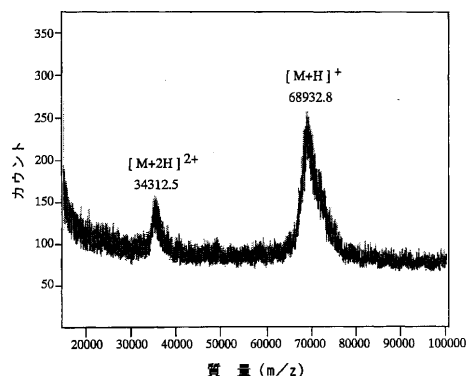
【図3】本発明のモノクローナル抗体の純度を確認し分子量を調べるために測定したマルディットフマスのスペクトラムの1例である。

【図4】本発明のモノクローナル抗体を用いたELISA法におけるS B濃度と吸光度の関係を示すグラフである。

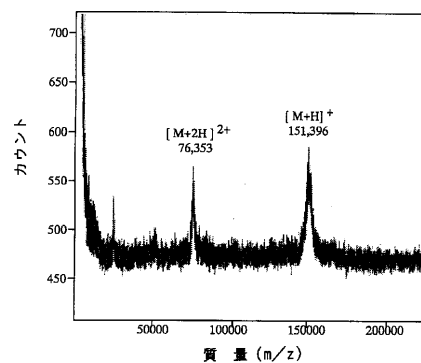
【図1】



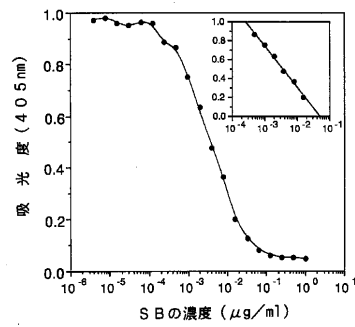
【図2】



【図3】



【図 4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
G 0 1 N 33/577		C 1 2 N 5/00	B

(72)発明者 森永 紀	F ターム (参考)	4B024 AA11 BA53 GA03 HA15
福岡県福岡市東区馬出 3-1-1 九州大		4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
学薬学部内		4B065 AA92X AB05 AC14 BA08
		CA25 CA46
		4H045 AA11 AA20 BA10 BA42 CA30
		DA76 EA50 FA72

专利名称(译)	抗Senoside B单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2002065258A	公开(公告)日	2002-03-05
申请号	JP2000258338	申请日	2000-08-29
申请(专利权)人(译)	有限公司，产学合作机制九州		
[标]发明人	正山征洋 田中宏幸 森永紀		
发明人	正山 征洋 田中 宏幸 森永 紀		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/16 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/16 C12P21/08 G01N33/53.S G01N33/577.B C12N15/00.C C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/BA10 4H045/BA42 4H045/CA30 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种简单的方法来分析森诺甙B (SB)，后者是大黄等药用植物中所含的主要苷。属于IgG2b或IgG1子类的单克隆抗体，具有κ轻链并与SB特异性反应。通过将骨髓瘤细胞与用SB-血清白蛋白复合物免疫的动物（最好是小鼠）的抗体产生细胞融合而获得，该抗体是通过在EDC存在下使SB与牛或人血清白蛋白反应而获得的。选择性地培养由此获得的杂交瘤，并通过筛选和克隆产生针对SB的单克隆抗体的杂交瘤。通过将该单克隆抗体应用于免疫测定法例如ELISA法，可以容易且高度灵敏地定量SB。

