

(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 - 112767

(P2002 - 112767A)

(43)公開日 平成14年4月16日(2002.4.16)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/02		C 0 7 K 16/44	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/44		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 5 O L (全 9 数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 303003(P2000 - 303003)

(22)出願日 平成12年10月3日(2000.10.3)

(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

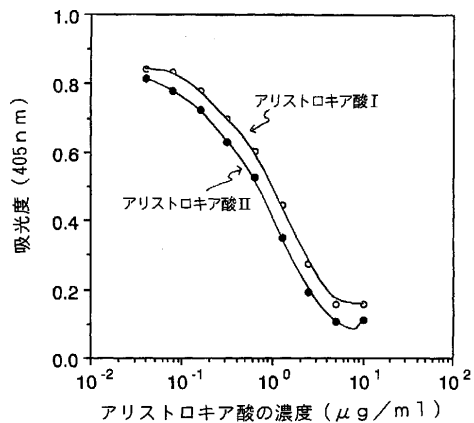
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗アリストロキア酸モノクローナル抗体

(57)【要約】

【課題】 アリストロキア酸の簡便な分析手段を提供する。

【解決手段】 I g G 2 b のサブクラスに属し 軽鎖を保有しアリストロキア酸に対して特異的に反応するモノクローナル抗体。E D C の存在下にアリストロキア酸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アリストロキア酸 - 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髄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、アリストロキア酸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アリストロキア酸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】 アリストロキア酸Iおよび/またはアリストロキア酸IIを認識することを特徴とする抗アリストロキア酸モノクローナル抗体。

【請求項2】 IgG2のサブクラスに属し、軽鎖を保有することを特徴とする請求項1の抗アリストロキア酸モノクローナル抗体。

【請求項3】 請求項1または2の抗アリストロキア酸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アリストロキア酸Iおよび/またはアリストロキア酸II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形成されたアリストロキア酸Iおよび/またはアリストロキア酸IIと該血清アルブミンとの複合体で免疫された動物の抗体産生細胞と骨髄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、アリストロキア酸Iおよび/またはII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ことを特徴とする方法。

【請求項4】 抗体産生細胞としてマウスのひ細胞、骨髄腫細胞としてマウスの骨髄腫細胞を用いることを特徴とする請求項3の抗アリストロキア酸モノクローナル抗体の作製方法。

【請求項5】 請求項1または2の抗アリストロキア酸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、モノクローナル抗体の技術分野に属し、特に、アリストロキア酸に特異的に反応する抗アリストロキア酸モノクローナル抗体に関する。

【0002】

【従来の技術とその課題】アリストロキア酸(アリストロキア酸:以下、Ariと略称することがある)はウマノズクサ科植物に含有される成分である。ヨーロッパで瘦身茶を飲用した人が重篤な腎炎を起こしたことから原因成分が検討され、本化合物が単離、同定された。また、日本においても漢方薬、特に中国産の当帰四逆加ごしゅゆ生姜湯を服用した患者が同様の腎炎を起こし、重大な副作用となった。これは日本の処方と中国の処方では配合生薬が異なり、中国ではウマノズクサ科に属する生薬を用いていたことに起因する。このような状況から漢方薬や生薬中のアリストロキア酸の存否を検定することが副作用を回避するために重要であることが指摘され、本化合物の簡便で正確な分析法が切望されている。また、本化合物が腎炎を惹起する生理学的なメカニズムは不明であるので、体内動態や代謝、更にはタンパクとの結合性等を詳細に調査する必要性が叫ばれているが、この要求に合うような簡便且つ高感度のアリストロキア

酸の分析手段は未だ確立されていない。

【0003】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)と癌細胞である骨髄腫細胞(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、アリストロキア酸は低分子のため通常は抗原となり得ず、アリストロキア酸に対するモノクローナル抗体は知られていなかった。

【0004】

【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アリストロキア酸で動物を免疫し、細胞融合によりアリストロキア酸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得、このハイブリドーマから、アリストロキア酸の分析に供し得る抗アリストロキア酸モノクローナル抗体を大量に生産することに成功し、本発明を導き出した。

【0005】かくして、本発明は、アリストロキア酸Iおよび/またはアリストロキア酸IIを認識する抗アリストロキア酸モノクローナル抗体を初めて提供するものである。さらに、本発明は、そのような抗アリストロキア酸モノクローナル抗体の具体例として、IgG2bのサブクラスに属し、軽鎖を保有する抗アリストロキア酸モノクローナル抗体を提供する。

【0006】本発明は、さらに、上記のごとき抗アリストロキア酸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アリストロキア酸Iおよび/またはアリストロキア酸II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形成されたアリストロキア酸Iおよび/またはアリストロキア酸IIと該血清アルブミンとの複合体で免疫された動物の抗体産生細胞と骨髄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、アリストロキア酸Iおよび/またはII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(選抜)およびクローニングする工程を含む。本発明に従う抗アリストロキア酸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、骨髄腫細胞としてマウスの骨髄腫細胞を用いる。さらに、本発明は、これらの抗アリストロキア酸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。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明の抗アリストロキア酸モノ

クローナル抗体は、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)抗原としてアリストロキア酸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)抗アリストロキア酸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)して抗アリストロキア酸モノクローナル抗体を得る。以下、各工程について詳細に説明する。

【0008】(1)抗体産生細胞の調製

アリストロキア酸には、アリストロキア酸I(Ari I)およびアリストロキア酸II(Ari II)があることが知られている(図1参照)。本発明においては、これらのアリストロキア酸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。すなわち、弱酸性(pH5)に調整した溶液中でEDC[N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジミド]の存在下にAri Iおよび/またはAri IIとBSA(またはHSA)とを反応させることにより、それらのアリストロキア酸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て形成したアリストロキア酸-BSA(またはHSA)複合体を用いて免疫する。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、マルディクトフ(MALDI-tof)スペクトル測定により、BSA(またはHSA)の1分子当たり5~40分子のアリストロキア酸が結合されていることを確認したアリストロキア酸-BSA(またはHSA)複合体を用いる。

【0009】本発明に従えば、Ari IおよびAri II(すなわち、Ari IとAri IIの混合物)を用いてBSA(またはHSA)との複合体として免疫することにより、Ari IおよびAri IIを認識する抗アリストロキア酸が得られる。また、Ari IまたはAri IIのいずれかを用いBSA(またはHSA)の複合体として免疫すると、それぞれAri IおよびAri IIのいずれか一方のみを認識する抗アリストロキア酸が得られるとともに、Ari IおよびAri IIの両方を認識する抗アリストロキア酸モノクローナル抗体も得られることが見出されている。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臓、リンパ節、末

梢血液等から分離した細胞が使用される。

【0010】(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。本発明の抗アリストロキア酸モノクローナル抗体を作製するのに特に好ましい組み合わせはマウスのひ細胞/マウスの骨髓腫細胞である。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。

【0011】(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。

【0012】(4)ハイブリドーマの選択培養

融合を終えた細胞は、10%FC5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。

【0013】(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、アリストロキア酸(Ari Iおよび/またはAri II)とBSA(またはHSA)との複合体と反応させ、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法により目的の抗アリストロキア酸モノクローナル抗体産生能を有するハイブリドーマを選抜する。

【0014】(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、抗アリストロキア酸産生ハイブリドーマを得る。

【0015】(7)抗Ari 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アリストロキア酸モノクローナル抗体(抗Ari MAb)が得られる。MAb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Ari MAbを得る。

【0016】抗Ari MAbのキャラクタリゼーション

取得した抗Ari MAbの免疫グロブリンクラスの間定や軽鎖の特性などは通常の方法(例えば、オクタロニ法)で決定する。また、抗Ari MAb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)マスペクトル測定から知ることができる。

【0017】以下のようにして、本発明に従えば、アリストロキア酸(Ari Iおよび/またはAri II)をBSA(またはHSA)との複合体としてマウスに免疫することにより、アリストロキア酸(Ari Iおよび/またはAri II)には特異的に反応するが、その他の関連化合物には交差反応性を示さないモノクローナル抗体が得られる。得られるモノクローナル抗体は、一般にIgG2bのサブクラスに属し、軽鎖を有するものであるが、他のイムノグロブリンクラスに属するモノクローナル抗体も得られる。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。

【0018】

【実施例】実施例1:抗Ari MAbの作製

(1) 抗原の調製: アリストロキア酸(Ari IとAri IIの混合物: Sigma社より入手) 3mgをテトラヒドロフラン1.2mlに溶かした溶液を、3.8mgのBSA(和光純薬製)を20mMのリン酸塩系緩衝液(pH5)に溶かした溶液に攪拌しながら添加した。反応溶液にEDC18mgを加え、15時間攪拌反応した。反応後、精製に対して透析し、凍結乾燥し3.5mgのAri-BSA複合体を得た。

【0019】(2) 抗原中のハプテン数の検討: 得られたAri-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エルに入れ、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20分子のAriが結合していることを確認した。

【0020】(3) 免疫細胞の調製: Ari-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Ari-BSA複合体(不完全フロイントアジュバント溶液)を2回同様に投与し、最後にAri-BSA複合体のみ(不完全フロイ

ントアジュバント溶液)を100μg投与し免疫を完了した。3日後にマウスを麻醉下層殺し、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。

【0021】(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をする。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、1分間静置した後、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ウエ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。

【0022】(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エルの液を採取し、Ari-BSA複合体を結合させた別のウエルに添加し、直接的ELISAによりアリストロキア酸に対するMAb産生ハイブリドーマのスクリーニングした。即ち、96ウエルマイクロプレートにAri-BSA複合体0.5μg/100μl/ウエルを分注し、37で1時間インキュベートしてウエルに吸着させた。このウエルに培養上清を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(TPBS)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倍希釈液をウエルあたり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-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。発色したウエルの細胞を採取した。

【0023】(6) 抗Ari-MAb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エルに分注した。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、アリストロキア酸に対するMAbを産生するハイブリドーマ1A8を得た。

【0024】(7) 抗Ari-MAbの調製: 上記の抗体産生ハイブリドーマ1A8を無血清培地(100μg/mlインスリン、35μg/mlトランスフェリン、

20 μMエタノールアミン、25 nMセレンウム添加e R D F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10 mMリン酸緩衝液で洗浄後、吸着している抗体を100 mMクエン酸緩衝液で溶出した。得られた抗体溶液はPBSに対して3回透析し、最後に凍結乾燥して精製した抗アリストロキア酸モノクローナル抗体(MAb-1A8)を得た。

【0025】(8) MAbの免疫グロブリンクラスと分子量：精製したMAb-1A8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、IgG2bのサブクラスに属し、軽鎖を保有するものであることが示された。

【0026】また、精製したMAb-1A8にシナピン酸を混合してマルデイトフマス(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、約147,100であった。図3にマルデイトフマスのスペクトラムを示す。

【0027】実施例2：競合的ELISAによる定量試験

実施例1で作製したモノクローナル抗体(MAb-1A8)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。Ari-BSA複合体溶液(5 μg/ml)を100 μlずつウエルに添加し1時間反応し吸着させた。非特異的結合を除去するためにスキนมルク添加PBS溶液300 μlを加え1時間反応してブロッキングした。50 μlの各種濃度のAri IまたはAri IIに10%10 mM炭酸水素ナトリウム溶液とメタノールの混液(9:1)を加え、さらにモノクローナル抗体(MAb-1A8)溶液(2 μg/ml)50 μlを添加して1時間インキュベートした。T-PBS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100 μlを加え1時間反応した。1時間後にT-PBSで洗浄した。0.003%過酸化

水素、ABTS0.3 mg/ml含有クエン酸緩衝液を添加して発色させた。15分後に発色を405 nmで測定し、各濃度のAri IまたはAri II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、Ari IまたはAri IIの濃度は、 10^{-2} ~ 10^1 μg/mlの濃度範囲において吸光度と良い相関を有し、このモノクローナル抗体がアリストロキア酸Iおよびアリストロキア酸IIに対する優れた定量手段を提供することが理解される。

【0028】実施例3：交差反応性試験

実施例1で作製したモノクローナル抗体(MAb-1A8)の特異性を確かめるために、アリストロキア酸(Ari IおよびAri II)および各種関連化合物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(1 mg)を正確に秤り10 mM炭酸水素ナトリウム溶液とメタノールの混液(9:1)(pH8.3)(1 ml)に懸濁し10分間超音波処理した。上清を10 mM炭酸水素ナトリウム溶液とメタノールの混液(9:1)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Ari I溶液を50 μl/ウエルずつウエルプレートに分注し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50 μl [MAb-1A8(0.1 μg/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：

$$CR(\%) = \left[\frac{(A/A_0 = 0.5 \text{となるAri Iの濃度})}{(A/A_0 = 0.5 \text{となる検液の濃度})} \right] \times 100$$

ここで、Aはサンプルの吸光度、A₀は10 mM炭酸水素ナトリウム溶液とメタノールの混液(9:1)の吸光度を表わす。その結果を表1に示す。

【0029】

【表1】

化合物	交差反応性 (%)
アリストロキア酸 I	100
アリストロキア酸 II	147
アントラキノン	
センノサイド A	<0.7
レイン	<0.7
エモディン	<0.7
アロエーエモディン	<0.7
バルバロイン	<0.7
1,4-ジヒドロキシアントラキノン	<0.7
スチルベン	
ラボンチシン	<0.7
フェノール酸	
没食子酸	<0.7
バニリン酸	<0.7
カフェイン酸	<0.7
ホモゲンチジン酸	<0.7
クマリン	
エスクリン	<0.7
タンニン	
シンナムタンニン B1	<0.7
フラボノイド	
バイカリン	<0.7
ナリンジン水和物	<0.7
ウオゴニン	<0.7
ウオゴニン-7-O-β-グルクロニド	<0.7
クルクミノイド	
クルクミン	<0.7
カンナビノイド	
Δ ¹ -THCA	2.2
Δ ¹ -THC	<0.7

【0030】

【発明の効果】以上の説明から明らかなように、本発明は、ウマノスズクサ科植物等に含有されるアリストロキア酸（アリストロキア酸 I および / またはアリストロキア酸 II）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。この本発明の抗アリストロキア酸モノクローナル抗体を E L I S A 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アリストロキア酸の分析が可能となり、各種の漢方薬、生薬、植物、それらの諸器官等に含有されるアリストロキア酸を定量することにより、それらの薬理学的品質評価やアリストロキア酸が関与する生理学的作用の体内動態や代謝のメカニズム解明に資することができる。

【図面の簡単な説明】

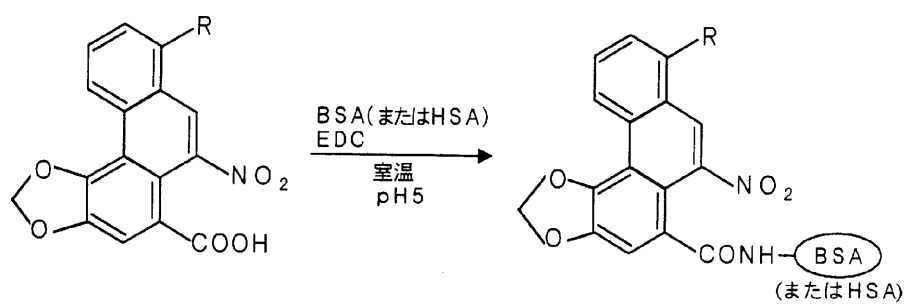
【図 1】本発明の抗アリストロキア酸モノクローナル抗体を作製するのに用いられるアリストロキア酸 - B S A（または H S A）複合体が形成される反応を模式的に示す。

【図 2】アリストロキア酸 - B S A 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。

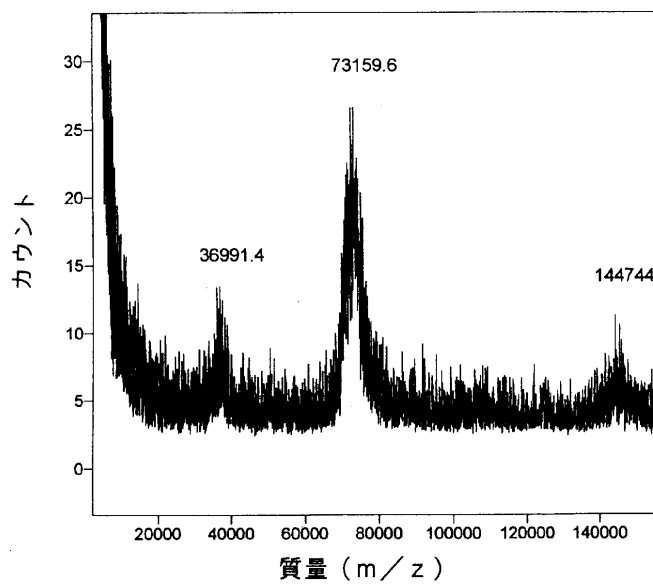
【図 4】本発明のモノクローナル抗体を用いた E L I S A 法におけるアリストロキア酸濃度と吸光度の関係を示すグラフである。

【図1】

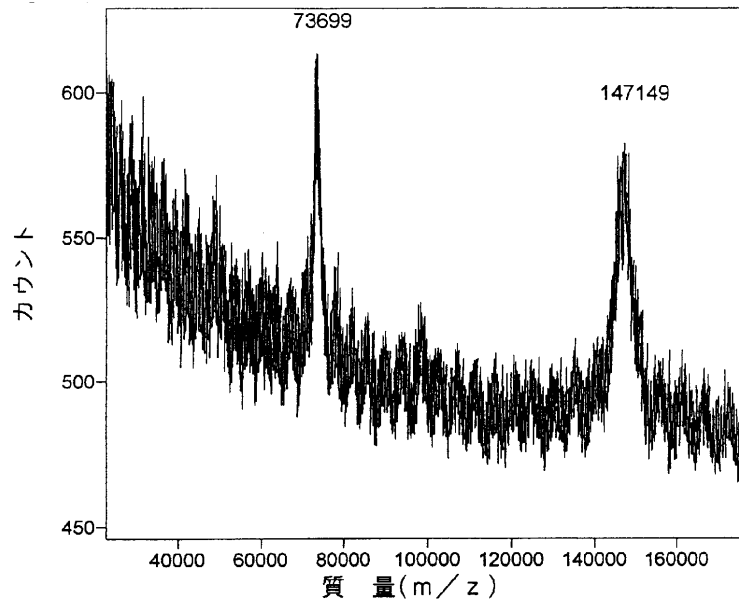


	R
アリストロキア酸 I	OCH ₃
アリストロキア酸 II	H

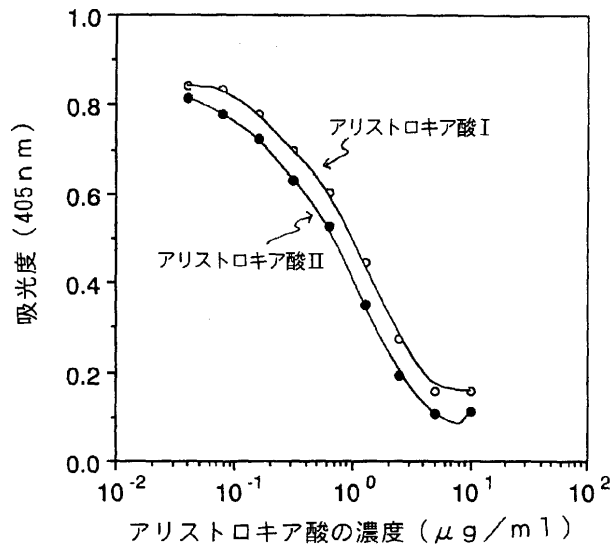
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷
G 0 1 N 33/577

識別記号

F I
C 1 2 N 5/00

テ-コード (参考)
B

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA53 GA03 HA15
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
4B065 AA92X AB05 AC14 BA08
CA25 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 BA50 CA40
DA76 DA86 EA50 FA72 GA10
GA26 HA07

专利名称(译)	抗Aristroikia单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2002112767A	公开(公告)日	2002-04-16
申请号	JP2000303003	申请日	2000-10-03
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		
发明人	正山 征洋 田中 宏幸		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/44 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/44 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/AA30 4H045/BA50 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA10 4H045/GA26 4H045/HA07		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种分析马兜铃酸的简单方法。一种单克隆抗体，属于IgG2b的一个亚类，具有κ轻链，可与马兜铃酸特异性反应。将骨髓瘤细胞与用马兜铃酸-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，该复合物是通过马兜铃酸与牛或人血清白蛋白在EDC存在下反应获得的。通过选择性地培养由此获得的杂交瘤，并筛选和克隆产生抗马兜铃酸单克隆抗体的杂交瘤来制备。通过将该单克隆抗体应用于免疫测定法例如ELISA法，可以容易且高灵敏度地定量马兜铃酸。

