

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-346051

(P2004-346051A)

(43) 公開日 平成16年12月9日(2004.12.9)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/16	C O 7 K 16/16	4 B O 6 4
C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	4 H O 4 5
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	S

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2003-147946 (P2003-147946)	(71) 出願人	598118503 正山 征洋 福岡県春日市上白水1217-1
(22) 出願日	平成15年5月26日 (2003.5.26)	(71) 出願人	393031450 アルプス薬品工業株式会社 岐阜県飛騨市古川町向町二丁目10番50号
		(71) 出願人	597112472 財団法人岐阜県研究開発財団 岐阜県各務原市須衛町4丁目179番地の1
		(74) 代理人	100068755 弁理士 恩田 博宣
		(74) 代理人	100105957 弁理士 恩田 誠

最終頁に続く

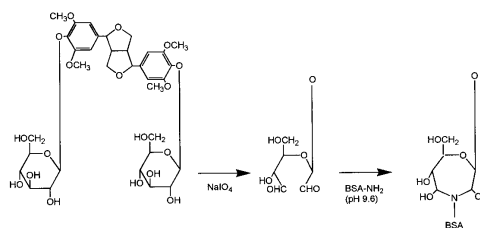
(54) 【発明の名称】 抗体、その製造方法及びエレウスロシド関連化合物の定量方法

(57) 【要約】

【課題】 エレウスロシド関連化合物の検出及び定量を容易に行うことができる抗体、その製造方法及びエレウスロシド関連化合物の定量方法を提供する。

【解決手段】 抗体は、エレウスロシド E を構成する糖の一部を切断し、その切断された末端に、牛血清アルブミン (BSA) 等の抗原性担体を共有結合させた抱合体を抗原として免疫動物に免疫することにより製造される。この抗体は、エゾウコギ中に含まれる有効成分であるエレウスロシド関連化合物 (エレウスロシド E、エレウスロシド B、メディオレシノールジグルコシド、ピノレシノールジグルコシド) に対して結合する。また、エレウスロシド B、メディオレシノールジグルコシド又はピノレシノールジグルコシドを用いて抱合体を作製し、その抱合体を抗原として抗体を製造してもよい。エレウスロシド関連化合物の定量方法は、前記抗体を用いた競合的 E L I S A によって行われる。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

エレウスロシド関連化合物に対する抗体であって、エレウスロシド E、エレウスロシド B、メディオレシノールジグルコシド又はピノレシノールジグルコシドに結合することを特徴とする抗体。

【請求項 2】

エレウスロシド関連化合物に対する抗体を製造する方法であって、エレウスロシド E、エレウスロシド B、メディオレシノールジグルコシド又はピノレシノールジグルコシドを構成する糖の一部を切断し、その切断された末端に抗原性担体を共有結合させたものを抗原として抗体を作製することを特徴とする抗体の製造方法。

10

【請求項 3】

請求項 1 に記載の抗体を用いて、競合的 E L I S A にてエレウスロシド関連化合物の濃度を定量することを特徴とするエレウスロシド関連化合物の定量方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

この発明は、エゾウコギに含まれる薬効成分であるエレウスロシド E や B 等のエレウスロシド関連化合物に対する抗体及びその製造方法、並びにその抗体を用いてエレウスロシド関連化合物の濃度を定量するエレウスロシド関連化合物の定量方法に関するものである。

【0002】

20

【従来の技術】

従来より、エタノール等を用いてエゾウコギから有効成分を抽出したエゾウコギエキスが知られている（例えば特許文献 1 参照）。

【0003】**【特許文献 1】**

特開平 5 - 1 8 6 3 6 0 号公報

【0004】**【発明が解決しようとする課題】**

前記従来のエゾウコギエキスでは、有効成分の含有量が極めて微量であることから、H P L C 等の精密な分析機器を用いて検出する以外には、その存在を検出する手段がなかった。また、前記有効成分の濃度を定量する場合も全く同様である。しかしながら、前記分析機器では、試料の調製や操作が非常に煩雑であることから、迅速かつ容易な検出又は定量を行うことはできなかった。

30

【0005】

この発明は、上記のような従来技術に存在する問題点に着目してなされたものである。その目的とするところは、エレウスロシド関連化合物の検出を容易に行うことができる抗体及びその製造方法を提供することにある。その他の目的とするところは、エレウスロシド関連化合物の定量を容易かつ高精度に行うことができるエレウスロシド関連化合物の定量方法を提供することにある。

【0006】

40

【課題を解決するための手段】

上記の目的を達成するために、請求項 1 に記載の発明の抗体は、エレウスロシド関連化合物に対する抗体であって、エレウスロシド E、エレウスロシド B、メディオレシノールジグルコシド又はピノレシノールジグルコシドに結合することを特徴とするものである。

【0007】

請求項 2 に記載の発明の抗体の製造方法は、エレウスロシド関連化合物に対する抗体を製造する方法であって、エレウスロシド E、エレウスロシド B、メディオレシノールジグルコシド又はピノレシノールジグルコシドを構成する糖の一部を切断し、その切断された末端に抗原性担体を共有結合させたものを抗原として抗体を作製することを特徴とするものである。

50

【 0 0 0 8 】

請求項 3 に記載の発明のエレウスロシド関連化合物の定量方法は、請求項 1 に記載の抗体を用いて、競合的 E L I S A にてエレウスロシド関連化合物の濃度を定量することを特徴とするものである。

【 0 0 0 9 】

【発明の実施の形態】

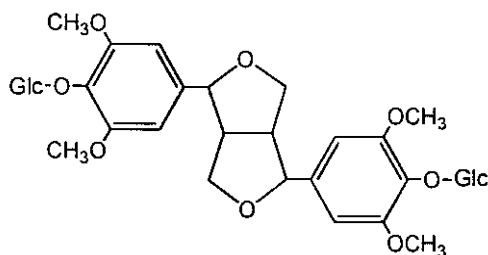
以下、この発明を具体化した実施形態を詳細に説明する。

実施形態の抗体は、エレウスロシド (E l e u t h e r o s i d e) 関連化合物 (以下、E 関連化合物と記載する) に対して結合するものである。前記結合するとは、E L I S A (E n z y m e - l i n k e d i m m u n o s o r b e n t a s s a y) 等の検出手段により特異的な抗原抗体反応が検出可能であることを意味する。前記 E 関連化合物としては、下記化 1 に示されるエレウスロシド E (E l e u t h e r o s i d e E)、下記化 2 に示されるエレウスロシド B (E l e u t h e r o s i d e B)、下記化 3 に示されるメディオレシノールジグルコシド (m e d i o r e s i n o l - d i - g l u c o s i d e)、下記化 4 に示されるピノレシノールジグルコシド (p i n o r e s i n o l - d i - g l u c o s i d e) 等が挙げられる。なお、下記化 1 ~ 化 4 に示される G l c はグリコシル基を示す。

10

【 0 0 1 0 】

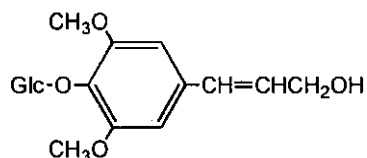
【化 1】



20

【 0 0 1 1 】

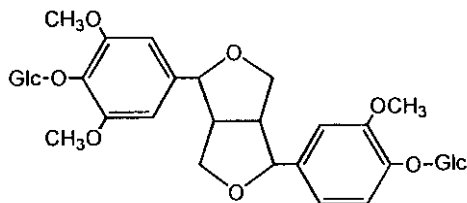
【化 2】



30

【 0 0 1 2 】

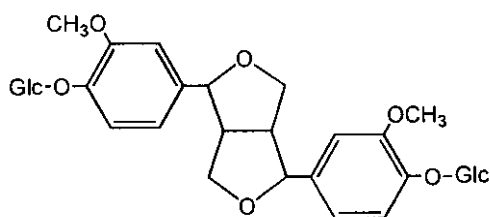
【化 3】



40

【 0 0 1 3 】

【化 4】



これら E 関連化合物はいずれも、アグリコンと、該アグリコンにグリコシド結合で繋がれた糖とからなる配糖体である。また、これらの E 関連化合物は、いずれもリグナン類の骨格（リグナン骨格）を有する配糖体である。これら E 関連化合物は、ウコギ科の植物エゾウコギ（*Acanthopanax senticosus* Harms = *Eleutherococcus senticosus* Maxim.）中に含まれる主要な有効成分であり、滋養強壮作用、鎮静作用、抗炎症（腫瘍抑制）作用、鎮痛・解熱作用、白血球増大作用、血圧降下（調整）作用、血糖降下作用、白髪防止・改善等の種々の薬理作用を發揮する。

10

【0014】

これらの E 関連化合物は、エゾウコギ等の植物組織中に極めて微量しか含有されていないうえ、抗原性がほとんどないことから、そのままの状態免疫動物（マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒツジ等）に免疫しても抗体が産生されず、さらに各種アジュバントとともに免疫しても抗体が産生されない。ところが、これらの E 関連化合物は、抗原性担体と共有結合した状態の抱合体を前記免疫動物に免疫することにより、強い抗原性が發揮されて抗体の産生が促進される。前記抗原性担体としては、それ単独で免疫動物に対して抗体産生を引き起こさせる性質を有しているうえ、アミノ基を備えたものが用いられる。さらに、この抗原性担体としては、比較的分子量が大きく、かつ免疫動物を死傷させないものであるが好ましく、例えばウシ血清アルブミン（BSA）、ヒト血清アルブミン（HSA）等の蛋白質が入手容易であることから好適に用いられる。なお、前記蛋白質は、抗原性を高めるために免疫動物とは異なる種由来のものであるのが好ましい。

20

【0015】

前記抱合体を作製する際には、例えば図 1 に示されるような反応が行われる。図 1 は、エレウスロシド E と BSA とからなる抱合体を作製する際の反応を模式的に示したものである。前記抱合体は、まず、エレウスロシド E の末端（一端又は両端）に存在する -D(+)-グリコシル基における 2 位の炭素原子と 3 位の炭素原子との間の C-C 結合を過ヨウ素酸ナトリウム等の強力な酸化剤を用いて切断した後、BSA のポリペプチド鎖内のアミノ基と共有結合させることにより得られる。前記アミノ基としては、BSA のポリペプチド鎖の N 末端に存在する -アミノ基、又はポリペプチド鎖内の特にリシン、アルギニン等のアミノ酸側鎖に存在するアミノ基が挙げられる。

30

【0016】

この抗体は、前記抱合体を抗原として用い常法に従って製造される。この抗体としては、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体（MAb）が挙げられるが、抗原抗体反応の特異性が高く、E 関連化合物の含有量をより正確かつ詳細に調査できることから、MAb であるのが好ましい。さらに、抗体のクラスとしては、抗原に対する結合定数が高く、より特異的に抗原と結合することができることから、免疫グロブリン G（IgG）であるのが好ましい。

40

【0017】

実施形態の E 関連化合物の定量方法は、E 関連化合物の含有量を迅速かつ容易に定量するために標識化免疫定量法を用いて行われる。前記標識化免疫定量法としては、酵素免疫定量法（EIA）や蛍光免疫定量法（FIA）が挙げられるが、取り扱いが容易かつ高感度であることから EIA を用いるのが好ましく、取り扱い性及び感度に優れていることから競合的 ELISA で定量するのが最も好ましい。

【0018】

50

この定量方法は、まず、一定量の抱合体を含む溶液を標識化免疫定量法に適したウェルに入れて静置し、該抱合体をウェルに吸着させた後、緩衝液等を用いてウェルを洗浄し、吸着されなかった抱合体を除去する。なお、前記抱合体としては、上記抗原性担体とE関連化合物とが共有結合された抱合体を用いても構わないが、非特異的な抗原抗体反応を抑えて定量精度を高めるために、上記抗体の製造に使用したものとは異なる担体とE関連化合物とが共有結合したものをを用いるのが好ましい。この担体としては、抗原性を有さないもの、又は前記抗原性担体とは異なる蛋白質若しくは同抗原性担体とは異なる種由来の蛋白質が好適に用いられる。なお、前記ウェルを洗浄した後、スキンミルク等のブロッキング剤を含有する緩衝液をウェルに加えて静置し、ブロッキング操作を行うのが好ましく、この場合には非特異的な抗原抗体反応を効果的に抑制することが可能となって定量精度がより一層向上する。

10

【0019】

続いて、E関連化合物を含有する濃度未知の溶液とともに一定量の抗体をウェルに添加してインキュベートし、抗原抗体反応を行わせる。その後、ウェルから溶液全てを除去し、標識化免疫定量法において使用される緩衝液で数回ウェルを洗浄し、好ましくはELISAにて発色させて定量を行う。ELISAで定量する場合、ウェル内の発色した溶液の吸光度を測定し、予め濃度既知のE関連化合物溶液の希釈系列から作製した検量線を利用して、濃度未知溶液中に含有されるE関連化合物の含有量が求められる。

【0020】

以上のようなE関連化合物の定量方法は、濃度未知溶液に存在するE関連化合物と前記抱合体とが、抗体に対して競合的に結合する性質を利用している。即ち、ウェルに吸着されている抱合体の量は一定であることから、ウェル内に遊離しているE関連化合物量に反比例して抱合体に結合する1次抗体の量が決定される。そして、1次抗体が結合した抱合体量に比例して標識化2次抗体が結合し、吸光度等の上昇によって濃度未知溶液中のE関連化合物含有量が定量される。

20

【0021】

次に、上記実施形態によって発揮される効果について説明する。

・ 実施形態のE関連化合物に対する抗体は、E関連化合物のうちの1種類又は複数種類に対し抗原抗体反応により特異的に結合するものである。この抗体は、エゾウコギエキス等に極めて微量にしか含有されていない有効成分としてのE関連化合物を迅速かつ容易に検出することができるうえ、E関連化合物の含有量を迅速かつ容易に定量することができる。このとき、極めて再現性の高いE関連化合物の検出又は定量を容易に行うことができることから、エゾウコギエキスを含む製品の品質管理を著しく容易に行うことができる。

30

【0022】

・ 実施形態の抗体の製造方法は、E関連化合物を構成する糖の一部を切断し、その切断された末端にアミノ基を有する抗原性担体を共有結合させた抱合体を抗原として用いて抗体を作製するものである。このため、この製造方法では、前記抱合体を抗原として用いることによって、抗原性がないE関連化合物の抗原性を飛躍的に高めることができ、E関連化合物に対する特異性の高い抗体を容易かつ確実に得ることができる。

【0023】

40

【実施例】

以下、前記実施形態を具体化した実施例及び比較例について説明する。

< 抗エレウスロシドE MA b 産生ハイブリドーマの製造 >

1) 抗原の調製：エレウスロシドE 5 mg をメタノール 4 ml に溶解した後、5 mg の過ヨウ素酸ナトリウムを水 0.6 ml に溶かした液を攪拌しながら滴下し、室温で1時間反応させた。前記エレウスロシドE は、中国産エゾウコギの粉碎物から30%エタノールで抽出した後に逆相HPLCにて精製したものである。次に、市販のBSAを溶解させた50 mM 炭酸塩緩衝液 (pH 9.6) 1 ml を添加し、攪拌しながら5時間反応させた。この反応液を水中 (4) にて透析した後に凍結乾燥したところ、エレウスロシドE - BSA 抱合体 (以下、E - BSA 抱合体と記載する) 4.8 mg が得られた。また、その後の

50

スクリーニングや定量等に使用するための抗原として、BSAの代わりにHSAを用いて上記と同様にエレウスロシドE-HSA抱合体（以下、E-HSA抱合体と記載する）を作製した。

【0024】

2) 抗原中のハプテン数の検討：得られたE-BSA抱合体を微量とり、過剰量のシナピン酸を加えて混合した後、その一部をマルデイトフマス・マススペクトログラフィー (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization-Mass Spectrography) にて質量 (m/z) を測定し、抗原 (抱合体) のハプテン数を推定した。結果を図3に示す。図3より、質量74321 m/z を頂点とするピークが抗原 (E-BSA) の質量を表している。BSAの分子量が66433、エレウスロシドEの分子量が742であることから、1分子のBSAに対して平均10.6分子のエレウスロシドEが共有結合していることが示された。

10

【0025】

3) 免疫脾細胞の調製：E-BSA抱合体50 μg 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。2週間及び4週間経過後、前記と同様にE-BSA抱合体アジュバント溶液を腹腔内投与し、6週間後にE-BSA抱合体100 μg を投与して免疫を完了した。3日後、マウスを麻酔下屠殺し、外科的に脾臓を摘出した。摘出された脾臓を細断した後、100メッシュのナイロン網で濾過して脾細胞を単離した。

【0026】

4) ハイブリドーマの調製：単離された脾細胞に低張液である155 mM塩化アンモニウム水溶液を加えて赤血球を溶血させた後、e-RDF培地 (ワコー純薬工業社製) を用いて脾細胞を3回洗浄した。同様に、培養したマウス骨髄腫細胞株P3-X63-Ag8-6.5.3 (HGPR T-) をe-RDF培地にて3回洗浄した。そして、適量のe-RDF培地に懸濁した脾細胞及び骨髄腫細胞の細胞数を計測し、脾細胞と骨髄腫細胞とを10対1の割合で混合した後、軽く遠心した。上清を除去した後、遠心管の底部に沈澱している細胞を十分に解きほぐし、PEG4000をe-RDF培地に溶解した溶液 (PEG4000の濃度は50重量%) を1.0 ml滴下し、37°Cで30秒間静置して細胞融合を行った。次に、e-RDF培地5 mlを5分間かけてゆっくりと添加した後、1000 rpmで10分間遠心した。10容量% FCSを含有するIMDM培地 (ワコー純薬工業社製) を用いて沈澱した細胞を洗浄し、軽く遠心して上清を捨てた。次に、 10^{-2} Mヒポキサンチン、 4×10^{-7} Mアミノプテリン、 1.5×10^{-5} Mチミジン及び10容量% FCSを含有するe-RDF培地 (HAT培地) を加えて沈澱した細胞を浮遊させ、96ウェルマイクロプレートに100 μl ずつ分注した。以後、3日毎にHAT培地を50 μl ずつ交換し、細胞 (ハイブリドーマ) の増殖を確認した。

20

30

【0027】

5) MA b抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング：ハイブリドーマの増殖が確認されたウェル内にある培養上清を採取し、予めE-HSA抱合体を結合させた別のウェルに添加した。それらのウェルに対してELISAにより発色させ、エレウスロシドEに対するMA b産生ハイブリドーマをスクリーニングした。即ち、96ウェルマイクロプレートに1 $\mu\text{g/ml}$ のE-HSA抱合体溶液を100 μl 添加し、37°Cで1時間インキュベートしてE-HSA抱合体をウェルに吸着させた。そして、これらのウェル内にハイブリドーマの培養上清を100 μl ずつ添加して抗原抗体反応を行った後、0.05容量%のTween 20を含有するリン酸緩衝液 (以下、T-PBSと記載する) を用いて3回洗浄した。次に、パーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (オルガノンテクニカチャペルプロダクツ社製) の1000倍希釈液 (希釈はT-PBSにより行われた) を1ウェル当たり100 μl ずつ添加し、1時間後にT-PBSで洗浄した。その後、0.003容量%過酸化水素及び0.3 mg/mlの基質である2,2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾ-チアゾリン-6-スルフォニックアシッド) ジアンモニウム塩 (ABTS) を含有する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

40

50

波長 405 nm における吸光度を測定し、有意な発色が確認されたウェルの細胞を採取した。

【0028】

6) 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複数のウェルに分注し、抗体産生能とともに増殖能を同時に有するハイブリドーマを選別した。このクローニング操作を合計 3 回行うことにより、1 種類のハイブリドーマ・クローンが得られた。

【0029】

7) 抗エレウスロシド E MA b の調製：前記 MA b 抗体産生ハイブリドーマを 10 μg / ml インスリン、35 μg / ml トランスフェリン、20 μM エタノールアミン及び 25 μM セレニウムを含有する e-RDF 無血清培地で 37、5% CO₂ の炭酸ガス培養器内で培養した。それらの培養上清をプロテイン G F F カラム (アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製) にかけて抗エレウスロシド E MA b を精製した。即ち、前記ハイブリドーマの培養上清を採取してトリス緩衝液で pH 7 に調整した後にプロテイン G F F カラムに吸着させ、10 mM リン酸緩衝液で洗浄した。そして、カラムに吸着されている抗体を 100 mM クエン酸緩衝液で溶出して抗体溶液を得た。得られた抗体溶液を水に対して 4 回透析し、最後に凍結乾燥することにより精製 MA b 抗体を得た。

10

【0030】

8) 競合的 ELISA による MA b 抗体の検量線の作製：1 μg / ml の E-HSA 抱合体溶液を 50 μl ずつウェルに添加し、1 時間静置してウェルに吸着させた。非特異的結合を除去するために、5% のスキンミルクを含有する PBS 溶液 300 μl を加え、1 時間静置してブロッキングした。各種濃度のエレウスロシド E 溶液 50 μl を 10 容量% メタノール水溶液に溶解した後、さらに 1 μg / ml の抗エレウスロシド E MA b 溶液 50 μl を添加して 1 時間インキュベートした。T-PBS を用いて 3 回ウェルを洗浄し、1000 倍希釈したパーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 100 μl を加え、1 時間インキュベートして反応させた。その後、T-PBS でウェルを洗浄し、0.003 容量% 過酸化水素及び 0.3 mg / ml ABTS を含有するクエン酸緩衝液を添加して発色させた。15 分経過後、波長 405 nm における吸光度を測定し、検量線を作製した。結果を図 4 に示す。なお、図 4 の横軸にはエレウスロシド E の濃度 (μg / ml) を示す。その結果、この検量線はエレウスロシド E 濃度が 0.01 ~ 1.3 μg / ml の範囲にある場合に特に有用であることが分かる。

20

30

【0031】

9) 交差反応性の調査：下記表 1 に示される E 関連化合物及びその類似化合物について、前記抗エレウスロシド E MA b に対する交差反応性を調査した。前記類似化合物としては、図 2 に示されるガーリック酸 (gallic acid)、シナピニック酸 (sinapinic acid)、バイカリン (baicalin)、オゴニン-7-O-グルクロニド (wogonin-7-O-glucuronide) を用いた (GlcA はグルクロン酸を示す)。即ち、まず、表 1 に示される化合物 (試験用化合物) 溶液 (溶媒は 10 容量% メタノール水溶液) の希釈系列 (濃度が 0 ng / ml であるものを含む) を用いて、前記 8) の競合的 ELISA と同じ方法により発色させて検量線を作製した。次に、これらの検量線から濃度 0 ng / ml の場合の吸光度に対して吸光度が 50% となる濃度 (以下、C₅₀ と記載する) を求め、以下に示す計算式に従って交差反応性 (%) を求めた。結果を表 1 に示す。

40

【0032】

【数 1】

$$\text{交差反応性 (\%)} = \frac{\text{エレウスロシド E の } C_{50}}{\text{試験用化合物の } C_{50}} \times 100$$

50

【 0 0 3 3 】

【 表 1 】

化合物	Cross reaction (%)
エレウスロシドE	100
エロウスロシドB	13.02
メディオレシノールジグルコシド	15.32
ピノレシノールジグルコシド	0.25
バイカリン	<0.05
ガーリック酸	<0.05
シナピニック酸	<0.05
オゴニン-7-O-βグルコシド	<0.05

10

表1の結果より、このMAb抗体は、前記類似化合物に対しては全く交差反応性を有しておらず、E関連化合物に特異的に反応するMAb抗体であることが示された。さらに、このMAb抗体は、エゾウコギに含まれる最も主要な有効成分であるエレウスロシドEに対し特に高い親和性を有するものであることが明らかとなった。さらに、このMAb抗体は、エレウスロシドB及びメディオレシノールジグルコシドに対し13~15%程度の弱い交差反応性が認められた。また、このMAb抗体は、ピノレシノールジグルコシドに対して、感度は極端に低いながらもその検出を行うことが可能であることも示された。

20

【 0 0 3 4 】

これらの化合物の構造を比較すると、上記化1~化4に示される各E関連化合物の端部に存在するグルコシル基及び該グルコシル基に近接する対向する一對のメトキシ基が前記MAb抗体によって認識されているものと推測される。さらに、前記グルコシル基及びメトキシ基の基端部に位置するベンゼン環も認識に関与しているものと推測される。加えて、前記一對のメトキシ基のうち的一方がない構造では、前記MAb抗体の認識が極端に低下されることも推測される。

【 0 0 3 5 】

また、この製造方法では、前記エレウスロシドE以外にも、その他のE関連化合物を抗原(抱合体)に用いた場合でも、各化合物に特異的に結合するであろう抗体が得られることが、この交差反応性の調査から明確に裏付けられた。さらに、前記抗体は、抗原(抱合体)として用いられた化合物以外のE関連化合物に対しても、ある程度の交差反応性が見られるものと推測され得る。

30

【 0 0 3 6 】

10) 各種エゾウコギ中のエレウスロシドE含有量の定量: 下記表2に示されるエゾウコギの乾燥粉末5mgにメタノール0.5mlを添加し、メタノール中に溶解された成分を抽出した。この抽出操作を合計5回行い、全ての抽出液を合わせて遠心分離を行い、不溶解物を沈澱させた。上清を10容量%メタノール水溶液を用いて適切な濃度に希釈し、前記MAb抗体を用いて、前記8)の競合的ELISAと同じ方法により発色させて波長405nmにおける吸光度を測定し、8)で作製した検量線を利用して各エゾウコギ中のエレウスロシドE含有量(重量%)を決定した。一方、通常行われている逆相HPLCにより、同じ試料についてエレウスロシドE含有量及びエレウスロシドB含有量を測定した。結果を表2に示す。

40

【 0 0 3 7 】

【 表 2 】

エゾウコギ の生産地	含有量 (重量%)		
	ELISA	HPLC	
		エレウスロシド [®] E	エレウスロシド [®] B
吉林省	0.171	0.184	0.014
吉林省	0.094	0.085	0.010
吉林省	0.115	0.118	0.017
吉林省	0.092	0.105	0.050
吉林省	0.199	0.077	0.017
吉林省	0.314	0.067	0.023
黒龍江省	0.091	0.062	0.036
黒龍江省	0.426	0.107	0.004
黒龍江省	0.119	0.134	0.010
遼寧省	0.525	0.094	0.022

10

その結果、競合的 E L I S A で定量したエレウスロシド E 含有量の測定結果と、逆相 H P L C で定量したエレウスロシド E 含有量の測定結果とは非常に良好な一致を見たことから、競合的 E L I S A によるエレウスロシド E 含有量の定量が実用的なものであることが確認された。さらに、データは示さないが、競合的 E L I S A による定量は酵素反応による増幅作用を有していることから、逆相 H P L C 等の従来の定量方法よりも 1 0 0 0 倍程度高感度であり、極めて微量に含有される E 関連化合物の検出及び定量に適したものであると言える。従って、前記 M A b 抗体を用いた競合的 E L I S A による E 関連化合物の定量方法は、作業が極めて迅速かつ簡便であることから、E 関連化合物を含有する製品の品質検査に際して著しく実用的であるうえ、高感度かつ再現性が良好であって信頼性が高い方法であることが確認された。

20

【0038】

なお、本実施形態は、次のように変更して具体化することも可能である。

- ・ エレウスロシド B、メディオレシノールジグルコシド又はピノレシノールジグルコシドを用いて抱合体を作製した後、該抱合体を抗原として抗体を作製してもよい。このように構成した場合、上記エレウスロシド E と抗原性担体とからなる抱合体を抗原として作製された抗体の場合と同様に、抱合体を構成する E 関連化合物に対し特に高い特異性を持った抗体を容易に製造することができる。

30

【0039】

さらに、前記実施形態より把握できる技術的思想について以下に記載する。

- ・ エレウスロシド E、エレウスロシド B、メディオレシノールジグルコシド及びピノレシノールジグルコシドから選ばれる少なくとも 1 種に結合することを特徴とする抗体。このように構成した場合、エレウスロシド関連化合物の検出を容易に行うことができる。

【0040】

- ・ 前記抗原性担体はアミノ基を備えていることを特徴とする請求項 2 に記載の抗体の製造方法。前記抗原性担体は蛋白質であることを特徴とする請求項 2 に記載の抗体の製造方法。

40

【0041】

- ・ エレウスロシド関連化合物を定量する方法であって、担体と共有結合したエレウスロシド関連化合物を吸着させたウェルにエレウスロシド関連化合物溶液を添加し、さらに請求項 1 に記載の抗体を加えてインキュベートした後にウェルを洗浄し、標識化免疫定量法を用いてエレウスロシド関連化合物溶液中のエレウスロシド関連化合物濃度を定量することを特徴とするエレウスロシド関連化合物の定量方法。このように構成した場合、エレウスロシド関連化合物の定量を容易かつ高精度に行うことができる。

【0042】

50

・ 請求項 1 に記載の抗体を産生することを特徴とするモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ。このように構成した場合、エレウスロシド関連化合物の検出を容易に行うことができるモノクローナル抗体を極めて容易に製造することができる。

【 0 0 4 3 】

【 発 明 の 効 果 】

以上詳述したように、この発明によれば、次のような効果を奏する。

請求項 1 に記載の発明の抗体によれば、エレウスロシド関連化合物の検出を容易に行うことができる。請求項 2 に記載の発明の抗体の製造方法によれば、エレウスロシド関連化合物の検出を容易に行うことができる抗体を容易に製造することができる。請求項 3 に記載の発明のエレウスロシド関連化合物の定量方法によれば、エレウスロシド関連化合物の定量を容易かつ高精度に行うことができる。

10

【 図 面 の 簡 単 な 説 明 】

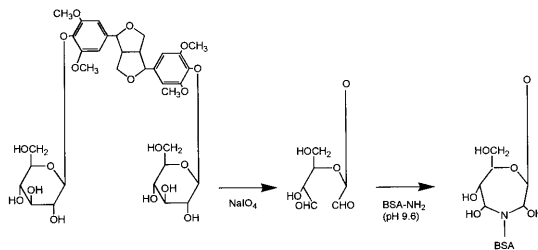
【 図 1 】 エレウスロシド E と B S A と の 結 合 反 応 を 模 式 的 に 示 す 反 応 式。

【 図 2 】 実 施 例 の 類 似 化 合 物 の 構 造 を 示 す 図。

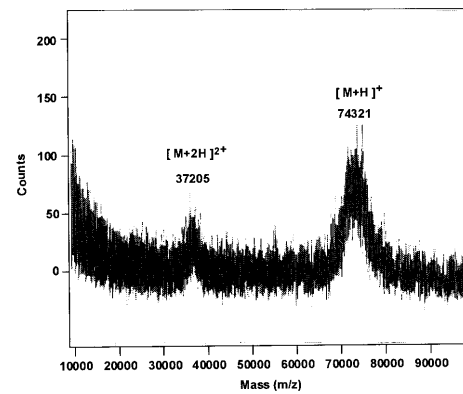
【 図 3 】 実 施 例 の 抗 原 の ハ プ テ ン 数 を 調 査 し た マ ス ス ペ ク ト ロ グ ラ フ。

【 図 4 】 実 施 例 の M A b 抗 体 の 検 量 線 を 示 す 片 対 数 グ ラ フ。

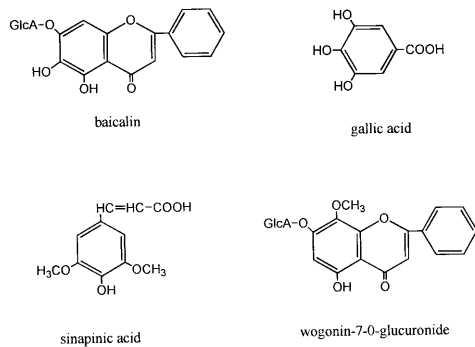
【 図 1 】



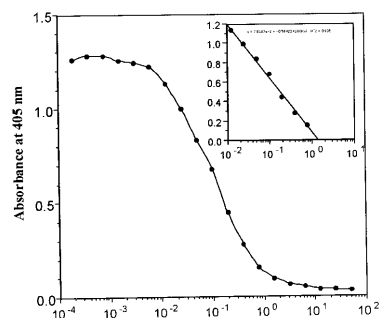
【 図 3 】



【 図 2 】



【 図 4 】



フロントページの続き

(72)発明者 田中 宏幸

福岡県福岡市東区箱崎 2 - 1 6 - 4 7 - 2 0 2

(72)発明者 正山 征洋

福岡県春日市上白水 1 2 1 7 - 1

Fターム(参考) 4B064 AG27 AG31 CA10 CA20 CC24 DA13

4H045 AA11 AA30 BA51 BA53 CA30 CA40 DA76 DA86 EA50 FA50

FA72

专利名称(译)	抗体，其制备方法和定量与Eleusroside相关的化合物的方法		
公开(公告)号	JP2004346051A	公开(公告)日	2004-12-09
申请号	JP2003147946	申请日	2003-05-26
[标]申请(专利权)人(译)	正山 征洋		
申请(专利权)人(译)	正山 征洋 阿尔卑斯山制药工业.有限公司 岐阜县基础研究发展基金会		
[标]发明人	田中宏幸 正山征洋		
发明人	田中 宏幸 正山 征洋		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/16 C12P21/08		
FI分类号	C07K16/16 C12P21/08 G01N33/53.S		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA51 4H045/BA53 4H045/CA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA50 4H045/FA72		
代理人(译)	昂达诚		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种能够容易地检测和定量伊杜糖苷相关化合物的抗体，其制备方法和定量伊杜糖苷相关化合物的方法。 解决方案：抗体是通过偶联物免疫的动物，该偶联物通过裂解构成伊洛糖苷E的一部分糖并将抗原载体（例如牛血清白蛋白（BSA））与裂解末端共价结合而获得。它是通过免疫制造的。该抗体与伊路洛素中所含的活性成分-伊路氏卵磷脂相关的化合物（伊路氏卵磷脂E，伊路氏卵磷脂B，间苯二酚二葡萄糖苷，松脂醇二葡萄糖苷）结合。可选择地，可以通过使用玫瑰果苷B，中肾上腺素二葡萄糖苷或松脂醇二葡萄糖苷来制备缀合物，并且可以通过使用所述缀合物作为抗原来制备抗体。使用抗体通过竞争ELISA进行定量与伊苏糖苷相关的化合物的方法。 [选型图]图1

