

(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2005-179288

(P2005-179288A)

(43) 公開日 平成17年7月7日(2005.7.7)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/16	C07K 16/16	4B064
C12P 21/02	C12P 21/02	4H045
G01N 33/53	G01N 33/53	
		C
		J

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願2003-424231 (P2003-424231)	(71) 出願人	598118503
(22) 出願日	平成15年12月22日 (2003.12.22)		正山 征洋
			福岡県春日市上白水1217-1
		(72) 発明者	田中宏幸
			福岡県福岡市東区箱崎2-16-47-2
			O2
		(72) 発明者	正山征洋
			福岡県春日市上白水1217-1
		Fターム(参考)	4B064 AG26 CA10 CA20 CC24 CE12
			CE17 DA13
			4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
			CA30 DA75 EA50 FA72 FA74
			GA26

(54) 【発明の名称】 抗ベルベリンモノクローナル抗体の製造方法並びに抗体を用いた抗原の定量方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 生薬の有効成分であるベルベリン、コプテイシンに対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマに関して、複雑な前処理を必要とせず、高感度、再現性良好に、一度に多量の分析を可能とする競合的 E L I S A を完成させる。

【解決手段】 ベルベリンを高温で加熱してベルベリンとする。このものをモノクロ酢酸と反応する。反応物を 1-エチル-3-(3'-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸 (EDC) と反応し、さらにタンパク質を結合させたものを抗原として抗体を作成する抗体の製造方法。

【選択図】 図 2

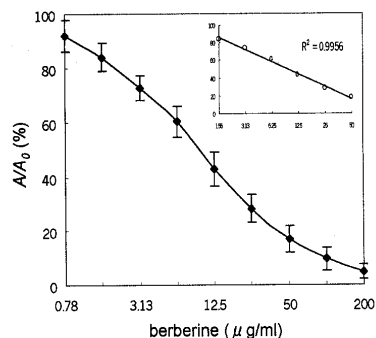


図 2 抗ベルベリンモノクローナル抗体を用いたベルベリンの検量線

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ベルベリン及び関連化合物に対する抗体。

【請求項 2】

前記ベルベリン及び関連化合物はコプテイシンである請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

ベルベリンを高温で加熱してベルベルピンとする。このものをモノクロロ酢酸と反応する。反応物を 1 - エチル - 3 - (3 ' - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミド塩酸 (EDC) と反応し、さらにタンパク質を結合させたものを抗原として抗体を作成する抗体の製造方法。

10

【請求項 4】

タンパク質と結合したベルベリン関連化合物を吸着させたウエルにベルベリン関連化合物溶液を添加し、更に請求項 1 に記載の抗体を加えてインキュベートした後にウエルを洗浄し、標識化免疫定量法を用いてベルベリン関連化合物溶液中のベルベリン関連化合物を定量する抗体を用いた抗原の定量方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明はオウレン、オウバクその他の生薬の有効成分であるベルベリン、コプテイシンに対するモノクローナル抗体 (M A b) を生産するハイブリドーマに関する。

20

【背景技術】**【0002】**

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。哺乳動物の脾細胞と癌細胞であるミエローマ細胞を融合させた雑種細胞をハイブリドーマと称する。ハイブリドーマは用いた脾細胞が産生する抗体産生能を有することから、多くの蛋白質やペプチドの様な高分子化合物に対する抗体の生産に用いられてきた。

【0003】

一方、本出願人は通常は抗原とは成りえないベルベリンに対する M A b を産生するハイブリドーマを作製する。生薬に含まれるベルベリン及び関連アルカロイド含量は産地や採取時期により品質的な変動が極めて大きいことが明らかとなった。このためオウレン、オウバクその他の関連生薬から製した生薬製剤や医薬品の一定した薬理効果を期待するためには、原料生薬の品質管理が不可欠となった。

30

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】****【0004】**

ベルベリンやコプテイシンの含有量は低く、また、多くの関連アルカロイドを含有するため、その定性、定量分析は容易ではない。従って含有量を精査するためには前処理等に多大な労力を要する。このため前処理を必要とせず、再現性があり、かつ高感度なアッセイ系が要求される。これに対応出来るのは M A b 以外にない。

40

【課題を解決するための手段】**【0005】**

本発明者等は、上述の問題点を解決すべく研究を重ねた結果、細胞融合によりベルベリンに対する、M A b を産生するハイブリドーマを得、本ハイブリドーマを培養することによって抗ベルベリン抗体を大量に生産することに成功した。本抗体を用いることによって高感度、再現性良好な、かつ前処理を必要としないアッセイ系を完結した。

【発明を実施するための最良の形態】**【0006】**

抗ベルベリン M A b を生産するハイブリドーマは以下の様に作成する。すなわち、(1) 抗原としてベルベリン - BSA 複合体を免疫した動物の抗体産生脾臓細胞を作成する。(2

50

）ミエローマ細胞を培養増殖し、調整する。（3）上記2種の細胞をポリエチレングリコールを媒体として融合する。（4）得られたハイブリドーマをHAT培地にて選抜する。（5）抗ベルベリンMAb生産ハイブリドーマを選抜する。（6）選抜ハイブリドーマをクローニングする。これらの行程について詳細に説明する。

【0007】

（抗体産生細胞の調整）

ベルベリン-BSA複合体を動物に免疫する。免疫法としてはフロイントのコンプリートアジュバンドを併用する手法がとられる。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、抹消血液等から分離した細胞が使用される。

10

【0008】

（骨髄腫細胞の調整）

細胞融合に使用する骨髄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、抗体産生細胞の調整に用いた動物と同種の細胞株を使用するのが好ましい。用いる細胞株は細胞融合の後に、未融合の骨髄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、マウス骨髄腫細胞株、PAI, P3?X63?Ag8, P3?X63?Ag8?UI, P3?NSI/1?Ag4?1, X63?Ag8?6.5.3, SP210?Ag14.FO, S194/5X XO, S194/5X XO, BU.1, MPC11?45.6, TG.1.7等が用いられる。

20

【0009】

（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、骨髄腫細胞と抗体産生細胞を混合（混合比は通常1:4-1:10）することにより行われる。融合促進剤としては平均分子量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。

【0010】

（ハイブリドーマの選択的増殖）

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はハイブリドーマである。

30

【0011】

（抗体産生ハイブリドーマの検索）

抗体産生ハイブリドーマの検索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、ベルベリン-HSAと反応させ、酵素、蛍光物質、発光物質などでラベルした2次抗体との反応により検索できる。

【0012】

（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い、MAb産生ハイブリドーマを得る。以上の操作により抗ベルベリンMAb産生ハイブリドーマID5-3B-7を得た。このハイブリドーマはベルベリンに対する特異的なMAbを産生する新規な細胞である。

40

【0013】

（抗ベルベリンMAbの調整）

上記で得られたハイブリドーマを適切な培地中で培養することにより、その培養上清から本発明MAbが得られる。大量に生産する方法としては骨髄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

50

採取し、通常の抗体分離操作により抗ベルベリンM A bを得る。また、無血清培地で培養し、通常の手法で抗ベルベリンM A bを得る。

【0014】

(抗ベルベリンM A bのキャラクタリゼーション)

精製した抗ベルベリンM A bのサブクラスはI G g 1、軽鎖は であることを、通常の方法で決定した。

【0015】

(発明の効果)

抗原であるベリベリンの一つのメトキシル基を水酸基に変換し、そこへリンカーを結合しキャリアタンパクを結合したものを抗原としたため、本抗体はベルベリン、コプテイシンを強く認識し、さらに弱いながらもパルマチンをも認識することが明らかとなった。従って通常のE L I S Aに用いることにより、ベルベリン、コプテイシンの分析を再現性高く、高感度、かつ前処理が不要な方法で実施可能となった。

10

【実施例】

【0016】

(抗ベルベリンM A b産生ハイブリドーマの製造)

(抗原の調整)

ベルベリン3 gを190 で15分間加熱後、水を加えてクロロフォルムで3回抽出する。クロロフォルムを減圧下留去する。残渣をL H 20カラムで精製してベルベルピンを得る。ベルベルピン100 mgをクロロフォルムに溶解し、モノクロロ酢酸300 mgを添加し室温下で反応する。反応物8 mgに1-エチル-3-(3'-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(EDC)8 mgのピリジン溶液を反応する。本溶液をB S Aの水溶液に少量ずつ添加し反応する。さらに3時間室温下で反応を続ける。反応終了後4 で2日間水に対して透析を行う。なおE L I S Aで使用するベルベリン?H S Aについても同様な方法で作製した。

20

【0017】

(抗原中のハプテン数の検討)

得られたベルベリン-B S A抱合体の微量をとり、過剰のシナピン酸を添加して混合する。混合物の少量をカセットのウエルに入れ、マルデイトフマスにて測定する(図1)。

【0018】

(免疫脾細胞の調整)

ベルベリン-B S A抱合体50 μgをフロイント-コンプリート-アジュバントに乳濁化させ、B A L B / C系マウスの腹腔内に投与した。以後、2週間の間隔で50 μgのベルベリン-B S A抱合体アジュバント溶液を2回同様に投与し、最後にベルベリン-B S A抱合体のみを100 μg投与し免疫を完結した。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。

30

【0019】

(ハイブリドーマの調整)

単離した免疫脾細胞に低張液(155 mM塩化アンモニウム)を加えて赤血球を溶血した後、e ?R D F培地で細胞を3回洗う。マウス骨髄腫細胞もe-RDF培地で3回洗浄した。両細胞数を計測し脾細胞と骨髄腫細胞を10:1の割合として遠心をする。上清を捨て、沈殿した細胞を充分解きほぐし、ポロエチレングリコール(P E G)4、000を培地で希釈した50%液を1.0 ml滴下して融合を行った。37 、30秒間静置した後、e ?R D F培地5 mlを5分間かけて添加した。1、000 rpm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4x10⁻⁷ Mおよびチミジン1.5x10⁻⁵ 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100 μlずつ分注した。3日毎に同一培地を50 μl追加し、細胞の増殖を確認した。

40

【0020】

50

(抗体産生ハイブリドーマの検索)

ハイブリドーマが増殖したウエルの液を採取し、ベルベリン-HSA抱合体を結合させた別のウエルに添加し、直接ELISAによりベルベリンに対するMAb産生ハイブリドーマを検索した。即ち、96ウエルマイクロプレートにベルベリン-HSA抱合体 $0.1\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ /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 $100\mu\text{l}$ ずつ分注し抗原抗体反応を行った。0.05% Tween 20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1000倍希釈液をウエルあたり $100\mu\text{l}$ 添加し、1時間後にTPBSで洗浄した。0.003%過酸化水素、ABTS $0.3\text{mg}/\text{ml}$ 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。

10

【0021】

(抗ベルベリン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クローンを得た。

【0022】

(抗ベルベリンMAbの調整)

上記の抗体産生ハイブリドーマを無血清培地($10\mu\text{g}/\text{ml}$ インスリン、 $35\mu\text{g}/\text{ml}$ トランスフェリン、 $20\mu\text{M}$ エタノールアミン、 25nM セレニューム添加e?RDF培地)で37℃、炭酸ガス培養器で培養した。上清をプロテインGFFカラムを用いて精製した。即ち、上清をトリス緩衝液でpH7に調整し、カラムに付す。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抗体をえた。

20

【0023】

(競合的ELISAによる定量)

ベルベリン-HSA抱合体溶液($1\mu\text{g}/\text{ml}$)を $100\mu\text{l}$ ウエルに添加し1時間反応し吸着させる。比特異的結合を除去するために5%スキムミルク添加PBS溶液 $300\mu\text{l}$ を加え1時間反応してブロッキングする。 $50\mu\text{l}$ の各種濃度の試料溶液を加え、さらに抗ベルベリンMAb溶液($1\mu\text{g}/\text{ml}$) $50\mu\text{l}$ を添加して1時間インキュベートした。TPBS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 $100\mu\text{l}$ を加え1時間反応した。1時間後にTPBSで洗浄した。0.003%過酸化水素、ABTS $0.3\text{mg}/\text{ml}$ 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405nmで測定。各濃度のベルベリンの吸光度から検量線を作成した(図2)。

30

【0024】

抗ベルベリンMAbを用いて通常の方法により各種関連化合物のクロスリアクションを検討して表の結果を得た。ベルベリンに100%クロスリアクションを持つとともに、コブテイシンに対しても141%のクロスリアクションを持つことが明らかとなった。また、バプマチンにも51%のクロスリアクションを持つものの、他の化合物にはアフィニティーを持たないことが明らかとなった。

40

【0025】

【表 1】

各種関連化合物に対する抗ベルベリンモノクローナル
抗体のクロスリアクション

化合物	クロスリアクション (%)
ベルベリン	100
コプテイシン	141
パルマチン	51
8-オキシベルベリン	0
コリダリン	0
パパベリン	0

10

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図 1】実施例の抗原のハプテン数を調査したマスペクトログラフィー。

20

【図 2】実施例のMAb抗体の検量線を示す片対数グラフ。

【図 1】

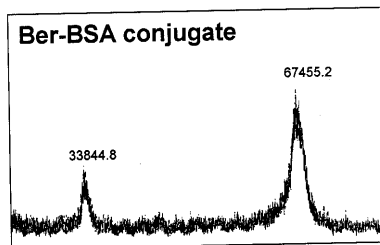


図1 ベルベリン-BSAコンジュゲートのMALDIマスペクトルによるハプテン数の分析

【図 2】

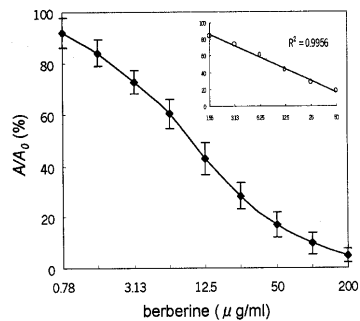


図2 抗ベルベリンモノクローナル抗体を用いたベルベリンの検量線

专利名称(译)	产生抗小檗碱单克隆抗体的方法和使用抗体定量抗原的方法		
公开(公告)号	JP2005179288A	公开(公告)日	2005-07-07
申请号	JP2003424231	申请日	2003-12-22
[标]申请(专利权)人(译)	正山 征洋		
申请(专利权)人(译)	正山 征洋		
[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 C12P21/02		
FI分类号	C07K16/16 C12P21/02.C G01N33/53.J		
F-TERM分类号	4B064/AG26 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/CE17 4B064/DA13 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA30 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：为产生抗小檗碱和coptaicin的单克隆抗体的杂交瘤提供竞争性ELISA，它们是粗药物的活性成分，具有高灵敏度，良好的重现性和一次大量分析，而无需复杂的预处理。完成。解决方案：小檗碱在高温下加热形成小ber碱。使它与一氯乙酸反应。一种产生抗体的方法，其包括使反应产物与1-乙基-3-(3'-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)反应，并且进一步使用与其结合的蛋白质作为抗原来产生抗体。[选择图]图2

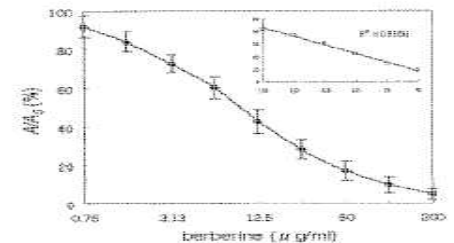


图2: 抗小檗碱单克隆抗体使用小ber碱的竞争性ELISA的抑制曲线