

|||||

総 説

|||||

薬用人参成分のイースタンプロットティング

森 永 紀, 正 山 征 洋

(長崎国際大学 薬学部 薬学科)

要 旨

イースタンプロットティングは TLC で分離した薬用成分を PVDF 膜へ転写し、抗原であるターゲット低分子のモノクローナル抗体で染色する手法で、目で見ることが出来る説得力の大きな手法である。新たに開発したイースタンプロットティングでは親水性ポリエーテルスルホン膜を用いることで、ジンセノシド類を膜上で展開・分離することが可能となり、転写プロセスを省略し、抗体染色が行える。さらに染色結果をスキャナーで取り込み、NIH Image 画像解析ソフトウェアを用いてスポットを数値化し、定量分析を完結させた。HPLC による分析値との相関も良好であった。

キーワード

イースタンプロットティング、ポリエーテルスルホン膜分離展開、ジンセノシド類、NIH Image 画像解析ソフトウェア

1. はじめに

欧米における代替医療の進展、また、高齢社会への突入によるメタボリックシンドロームの激増に伴い漢方薬を含む生薬製剤の需要の伸びが著しい。しかし日本で生産される漢方薬の配合生薬の90%以上は輸入に依存し、それら生薬の70%は野生種で賄われている。このため品質面が危惧されている。即ち、原料生薬の均質性が保証されない限り、生薬製剤の薬効を一定に保つことは不可能である。このために原料生薬の品質に関しては日本薬局方により厳しく規定されている(表1)。一方、2006年4月施行の第15改正日本薬局方においては、葛根湯、加味逍遙散、柴苓湯、大黃甘草湯、補中益気湯および苓桂朮甘湯の6処方が収載され、次回の改正時には20処方位まで増えると言われている。このことは現代医療における漢方薬の有用性が評価されたことを意味しており、大変重要な変革期に入ったと認識している。これらを背景に漢方薬とその配合生薬の標準化に関する研究がより重要となってきた。

従来の成分分析法はその殆どが高速液体クロ

マトグラフィー (HPLC) によりなされてきた(表1)。この方法は機械が高価で分離カラムも決して安価ではなく、劣化に伴う交換も余儀なくされる。さらに通常は有機溶媒を溶離液として用いるため、その分析法は高価であり、多くの手間を必要とする。

従来の分析法に対してモノクローナル抗体を

表1 日本薬局方規定による原料生薬の品質

アヘン末 (モルヒネ含量 9.5～10.5%)
ウワウルシ (アルブチン含量 7.0%以上)
オウゴン (パイカリン 10.0%以上)
オウバク (ベルベリン 1.2%以上)
オウレン (ベルベリン 4.2%以上)
カンゾウ (グリチルリチン酸 2.5%以上)
コウボク (マグノロール 0.8%以上)
シャクヤク (ペオニフロリン 2.0%以上)
センソ (プフォステロイド 5.8%以上)
センナ (総センノシド 1.0%以上)
センブリ (スエルチアマリン 2～10%)
ダイオウ (センノシドA 0.25%以上)
トコン (総アルカロイド 2.0%以上)
ベラドンナコン (ヒヨスチアミン 0.4%以上)
ボタンピ (ペオノール 1.0%以上)
ホミカ (ストリキニーネ 1.07%以上)
マオウ (エフェドリン 0.7%以上)
ロートコン (総アルカロイド 0.29%以上)

用いた薬用成分の分析法は、予備的精製のような前処理を必要とせず、しかも従来法に比べ感度が数百倍から数千倍と高く、再現性も良好である。さらに基本的には有機溶媒も必要としないため、環境に優しいエコ分析法と言える。

2. 研究の背景

2-1. 生薬由来薬用成分に対するモノクローナル抗体の作製

現在、タンパク等の高分子化合物に関わる研究においては、モノクローナル抗体なしでは研究の遂行は不可能と言っても過言ではない。しかし、低分子化合物 (= ハプテン) に対するモノクローナル抗体の作製例は医薬品等を除いてはさほど多くない。植物の二次代謝産物の特に低分子化合物 (= ハプテン) は、通常それ自体では免疫原性を持たないため、高分子のタンパクに結合して免疫原性を付与する必要があるが、ハプテン キャリアータンパクの合成が必ずしも容易ではないケースも多い。また、ハプテン分子の結合数の確定法も確立されていなかったため成功例が少なかったものと考えられる。そこで正山研究室においては、ハプテン キャリアータンパクコンジュゲートの matrix-assisted laser desorption/ionization of mass spectrometry (MALDI-Tof MS) による検出とそれによるハプテン数の確定方法を確立し、免疫化を確実なものとした¹⁾。図1は、薬用人参成分であるジンセノシド Re とキャリアータンパクである BSA を結合したスペクトルである。

この研究に端を発してアデニールシクラーゼを活性化し、cAMP を上昇させ強心作用薬として上市されているコルフォシンの原料 forskolin^{2,3)}、大麻成分⁴⁾、アヘンアルカロイド⁵⁾、ステロイダルアルカロイド配糖体の solamargine⁶⁾、サフランの活性成分クロシン⁷⁾、人参の活性配糖体であるジンセノシド Rb1、Rg1 及び Re⁸⁻¹⁰⁾、甘草の薬用成分グリチルリチン¹¹⁾、柴胡の活性成分サイコサポニン類^{12,13)}、

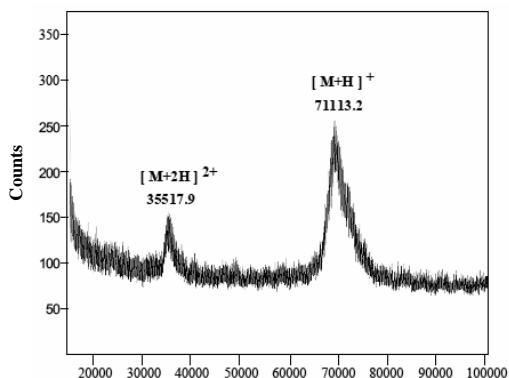


図1 ジンセノシド Re-BSA 複合体の MALDI-Tof MS による測定

大黃・センナの瀉下成分であるセンノシド A、B^{14,15)}、芍薬の活性成分ペオニフロリン¹⁶⁾、オウレン・オウバクの主アルカロイドのベルベリン¹⁷⁾ 等重要な漢方処方配合生薬の主要有効成分に対するモノクローナル抗体を作製し、生薬の標準化と品質評価法を確立すべく高感度なアッセイ系の構築とそれらの応用研究を行ってきた。

2-2. 高感度で再現性良好な定量法、競合的 ELISA の開発

図2は、これらの作製したモノクローナル抗体のうち人参のジンセノシド Re の検量線で、20-400ng/ml の検量域で良好な直線性を示している。

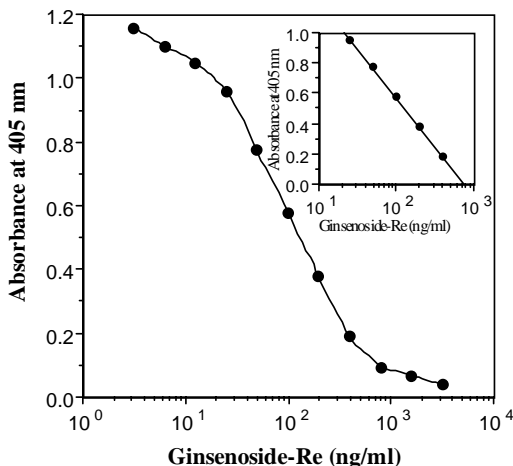
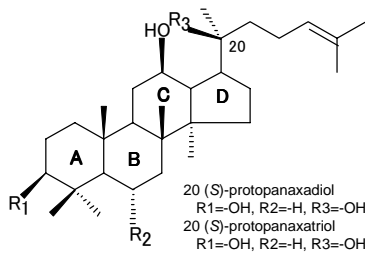


図2 ELISA によるジンセノシド Re 濃度と吸光度の関係

表2は、抗ジンセノシド Re モノクローナル抗体に対する他のジンセノシド類 (図3) やステロイド化合物の親和性を示したものである。



	Aglycone	R1	R2	R3
Ginsenoside Rb1	protopanaxadiol	-O-Glc- ² Glc	-H	-O-Glc- ⁶ Glc
Ginsenoside Rc		-O-Glc- ² Glc	-H	-O-Glc- ⁶ Ara
Ginsenoside Rd		-O-Glc- ² Glc	-H	-O-Glc
Ginsenoside Re	protopanaxatriol	-OH	-O-Glc- ² Rha	-O-Glc
Ginsenoside Rg1		-OH	-O-Glc	-O-Glc

図3 各種ジンセノシド類の構造式

表2 抗ジンセノシド Re モノクローナル抗体の交差反応性

化合物	交差反応性 (%)
ジンセノシド Re	100
ジンセノシド Rg1	70.94
ジンセノシド Rd	76.23
ジンセノシド Rc	0.046
ジンセノシド Rb1	0.045
サイコサポニン a	< 0.009
ジギトニン	< 0.009
ソラソニン	< 0.009
デオキシコール酸	< 0.009
グリチルリチン	< 0.009
エルゴステロール	< 0.009
ソラマルジン	< 0.009
コレステロール	< 0.009
-シトステロール	< 0.009
チクセツサポニン	< 0.009

ジンセノシド Re をはじめジンセノシド Rg1, Rd 等のプロトバナクサトリオール系、プロトバナクサジオール系ジンセノシド類に幅広く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、ジンセノシド類以外の化合物には殆ど交差反応性を示さなかった。

表3は、ELISA と HPLC により各種人参に含有するジンセノシド類の含量を分析したものである。本法は従来の HPLC と良い相関を持つことから、本抗体を用いる ELISA は、人参中に微量含有されている総ジンセノシドを特異的に定量分析できることが明らかとなった。また共になんら前処理を必要とせず、再現性良好で感度の面でも HPLC に比べ数百倍高感度であった。

2-3. イースタンプロットティング

高分子化合物に対するウエスタンプロットティングは必須のツールである¹⁸⁻²⁰⁾。しかしながら低分子化合物に対しては一般に不可能と考えられており、スフィンゴ糖脂質において成功例があるのみである²¹⁻²⁶⁾。正山研究室においては、solasodine 配糖体に対するモノクローナル抗体を作製し、低分子化合物を対象にした新しい免疫染色法「ウエスタンプロットティング」の開発に成功している²⁷⁾。その後本法は、アメリカ化学会誌 Analytical Chemistry のチーフエディターにより「イースタンプロットティング」と拝命され²⁸⁾、現在までに人参のジンセノシド類²⁹⁾、甘草のグリチルリチン²⁸⁾、サイコサポニン類³⁰⁾、その他大黄・センナのセンノシド A、

表3 各種人参中の総ジンセノシド含量

Sample	Concentration (µg/mg dry weight powder)						
	G-Rb1	G-Rc	G-Rd	G-Re	G-Rg1	Total Ginsenosides	
	HPLC	HPLC	HPLC	HPLC	HPLC	HPLC	ELISA
White ginseng	4.96 ± 0.03	2.38 ± 0.77	0.37 ± 0.03	1.23 ± 0.10	1.16 ± 0.10	10.10 ± 1.03	7.01 ± 0.62
Red ginseng	3.93 ± 0.20	2.43 ± 0.15	0.40 ± 0.04	1.16 ± 0.09	1.26 ± 0.12	9.18 ± 0.60	7.41 ± 0.55
<i>Panax notoginseng</i>	16.86 ± 0.39	3.81 ± 0.92	4.46 ± 0.18	3.58 ± 0.06	22.01 ± 0.31	50.72 ± 1.86	46.91 ± 4.07
<i>P. quinquefolium</i>	13.08 ± 0.17	6.01 ± 0.58	2.24 ± 0.16	16.63 ± 0.75	1.20 ± 0.13	39.16 ± 1.79	31.91 ± 6.81
<i>P. japonicus</i>	0.32 ± 0.06	ND	ND	0.25 ± 0.02	ND	0.57 ± 0.08	1.08 ± 0.11

Data are the means of triplicate assays ± SD. ND = not detectable.

Bに対して成功している。これらのうち人参のジンセノシド Rb1 について概説する。

2枚の TLC (薄相クロマトグラフィー) を用いて人参粗エキスを $n\text{-BuOH-EtOAc-H}_2\text{O}$ 系展開溶媒で展開する。1枚の TLC に吸着膜 (PVDF (ポリフッ化ビニリデン) 膜、Immobilon N、Millipore 社製) を覆い、ブロッキング液を噴霧後、120 程度の熱をかけ全成分を膜へ移行させる。しかしこのままの状態だと洗浄操作中にサポニンが流失して発色するには至らない。そこで膜を NaIO_4 液と処理することによりサポニンの糖鎖を開環する。そこへタンパクを加えシッフベースを形成し膜への吸着能を付与する。図4にイースタンブロッティングのプロトコルを示す。抗ジンセノシド Rb1 モノクローナル抗体で処理し、酵素標識2次抗体、基質を順次添加反応することにより発色させる。図5は、本抗体染色法のみカニズムを模式化したものである。

図6は各種人参のイースタンブロッティングである。TLC 上硫酸と加熱することにより全

ての化合物が発色するが(図6左) イースタンブロッティングによると人参特有のジンセノシド類のみが発色する(図6右)。実は抗ジンセノシド Rb1 モノクローナル抗体は ELISA で用いると極めて特異性が高い。ところが本イースタンブロッティングによるとジンセノシド Rb1 のみでなく、その他のジンセノシド Rc、Rd 等も発色している。これは糖鎖を開環したために親和性がルーズになり交差反応性が広くなり発色しているものと推察される。

またイースタンブロッティングの手法を応用すると人参切片の抗体染色が可能である。図7は人参切片を抗ジンセノシド Rb1 モノクローナル抗体を用いて染色したものである。人参サポニンの分布が如実に示されているのがわかる。人参同様に多量のサポニンを含む甘草や柴胡について、同様なイースタンブロッティングを行っても染色は認められないことから、生薬の組織切片をイースタンブロッティングすることにより、人参と他の生薬の鑑別を確かなものにする事も明らかとなった。

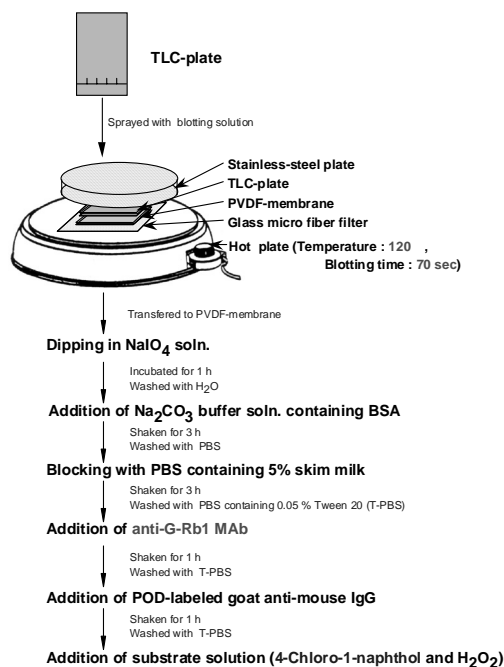


図4 イースタンブロッティングのプロトコル

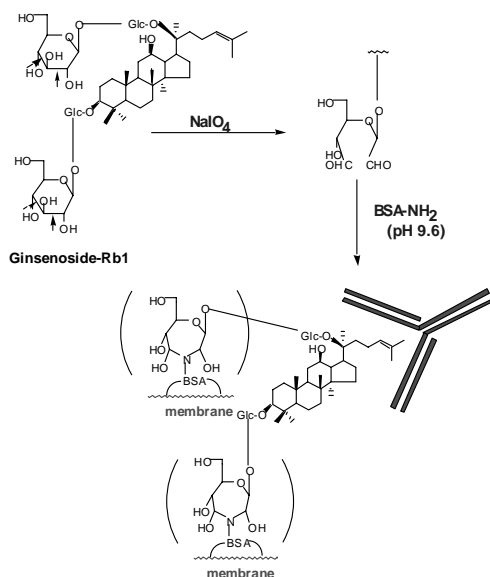


図5 イースタンブロッティングの染色模式図

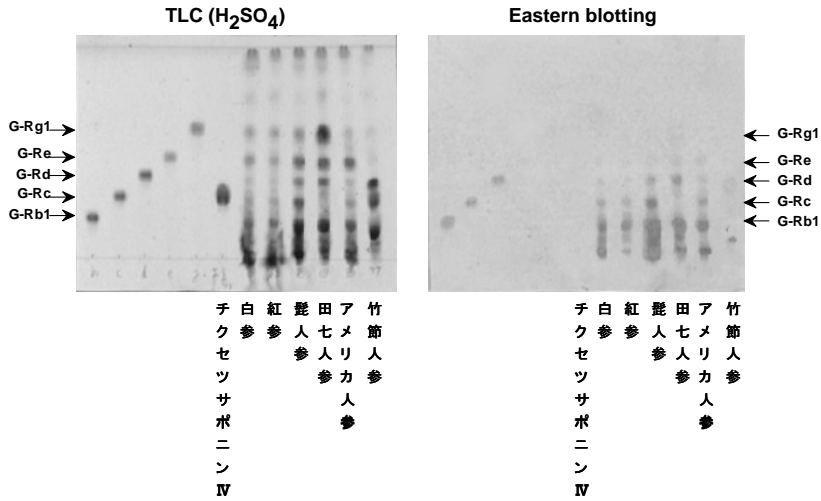


図6 各種人参のイースタンブロットィング

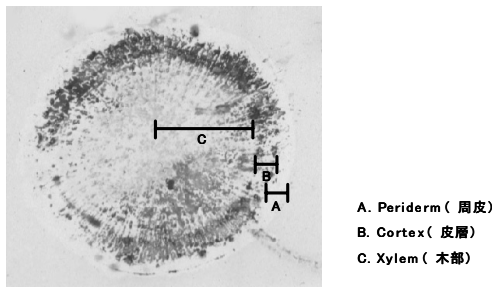


図7 人参切片のイースタンブロットィング

3. 新規イースタンブロットィングの開発

3-1. 概要

イースタンブロットィングは正山研究室において世界に先駆けて開発し命名した低分子薬用成分の新しい検出手法である。この方法はTLCで分離した薬用成分をPVDF膜へ転写し、過ヨウ素酸ナトリウム処理後、BSA溶液を添加し、目的低分子のモノクローナル抗体、酵素標識2次抗体、基質を順次添加し発色する手法で、検査者が目で見ることが出来、説得力の大きな手法との評価が高い。新規イースタンブロットィングの開発においては、膜上の染色スポットをデンスリトメーター等で定量化することを目標にスタートした。

しかしながら、従来使用していたプラス

チャージを施したPVDF膜が製造中止となり入手が不可能となった。そこで他社製のプラスチャージを施したPVDF膜、ナイロン膜、ニトロセルロース膜等を用いて検討を繰り返した。しかし、従来のように膜上で薬用成分を鮮明に抗体染色することは出来なかった。そこで新たに日本ポール(株)の研究協力を得て、従来の抗体染色と同等以上の染色効率を高める検討を行った。その結果、新しく開発したプラスチャージを施した親水性ポリエーテルスルホン膜(Mustang E、PALL社製)を用いることにより、従来のPVDF膜を使用した場合と同等な薬用人参成分のクリアな抗体染色を行うことに成功した(図8)。

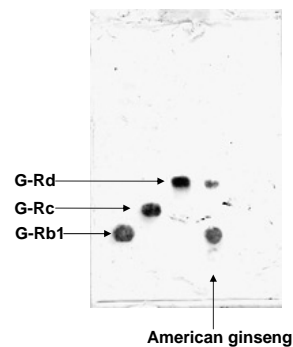


図8 ポリエーテルスルホン膜を用いたイースタンブロットィング

この成果を基に親水性ポリエーテルスルホン膜を用いた新たなイースタンプロッキングを定性分析と定量分析を同時に行うことが可能な手法への開発を目標に取り組んだ。具体的には、ジンセノシド類のような配糖体を該ポリエーテルスルホン膜を用いて直接展開・分離し、転写することなく配糖体を膜上で固定化、抗ジンセノシド Rb1 モノクローナル抗体を用いて染色し、画像解析ソフトウェア、表計算ソフトを用いて配糖体を定量分析するシステムの構築を展開した。

その結果、適切な展開溶媒で展開することにより、ポリエーテルスルホン膜でジンセノシド類をそれぞれ分離し、抗体染色することに成功した。さらに、NIH Image 画像解析ソフトを用いて、染色スポットのエリア面積を測定し、表計算ソフトを用いて検量線を作成し、ジンセノシド Rb1、Rc、Rd の定量分析を完結させた。定量値は HPLC による分析結果とよく近似していた³¹⁾。また、甘草成分のグリチルリチン³²⁾、アメリカ人参成分のジンセノシド Re³³⁾、柴胡のサイコサポニン類³⁴⁾ に対しても同様に膜による展開・分離、NIH Image を用いた定量分析が可能となった。これらの成果は、「配糖体の分析方法」で特許出願に至った³⁵⁾。以下、本開発研究の詳細について述べる。

3-2. 従来の技術とその課題

現在、タンパク質、ペプチド等の分析を行う場合、タンパク質、ペプチド等をポリアクリルアミドゲル等を用いた電気泳動により分離し、ナイロン膜や PVDF 膜へ転写して、当該膜上で抗原抗体反応もより染色するウエスタンプロッキングが汎用されている。しかしながら、ポリアクリルアミドゲル等を用いた電気泳動では、ジンセノシド類のような低分子化合物に対しては、分離能が低いと、薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いるのが一般的である。TLC は配糖体の分離能には優れる。しかしながら、分析対象物である配糖体等の検出のため

の発色を容易に行うことが出来ない場合があり、TLC プレート上で抗体を用いて抗原抗体反応により直接染色することは極めて困難である。

3-3. 課題を解決するための手段

上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、ジンセノシド類のような低分子化合物を膜によりそれぞれの成分に分離し、直接膜上で酸化反応により配糖体の糖部を開環し、タンパクを結合し膜へ結合させ、抗ジンセノシド Rb1 モノクローナル抗体を用いて抗原抗体反応により染色し、それら染色スポットを画像解析ソフトウェアにより分析し、それぞれのジンセノシド類を高感度に定量分析することに成功した。以下に本研究の特徴をさらに具体的に明らかにするために実施例を示す。

3-4. 各種人参中のジンセノシド類の含有量測定

3-4-1. 実施形態

(a) 各種人参や人参製剤、関連植物等の乾燥粉末 50mg をメタノール 1 ml にて 5 回抽出する。遠心分離にかけ上清のメタノールを窒素気流中で留去する。少量のメタノールに溶解し、ポリエーテルスルホン膜にスポットする。水、アセトニトリル、メタノール、酢酸、ギ酸等の混液で展開する。

(b) 展開したポリエーテルスルホン膜を過ヨウ素酸ナトリウム溶液 (10mg/ml) 中で 1 時間反応する。反応後膜を水洗いし、BSA 含有炭酸緩衝液に移し 3 時間反応する。反応後リン酸緩衝食塩水 (PBS) で洗浄する。非特異的結合を避けるためにスキนมilk リン酸緩衝食塩水 (PBS) で 3 時間ブロッキングを行う。以上の反応によりジンセノシド類が完全にポリエーテルスルホン膜へ固定化する。

(c) ポリエーテルスルホン膜へ抗ジンセノシド Rb1 モノクローナル抗体を添加し 3 時間反応する。ツイーン添加 PBS 溶液で洗浄し、

1,000倍希釈したパーオキシド標識抗マウスIgG ヤギ抗体を加えて1時間反応を行う。ツイーン添加 PBS で洗浄後、基質の4-クロロ-1-ナフトール、ジアミノベンジジン等と過酸化水素を添加して40分間反応して染色する。

3-4-2. 実施例

白人(図1のレーン : 以下同じ)、紅人(レーン)、ヒゲ人参(レーン)、田七人参(レーン)、アメリカ人参(レーン)、竹節人参(レーン)のメタノール抽出粗エキス、およびジンセノシド類のスタンダードである、ジンセノシド Rb1(レーン 1、2、3、4および5)をポリエーテルスルホン膜にスポットする。この膜を水 アセトニトリル 酢酸(体積比75:25:1)で展開する。展開した膜は上記の方法により抗体染色する(図9)。

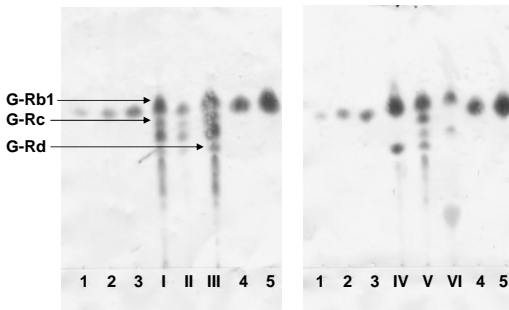


図9 各種人参中のジンセノシド Rb1、Rc、Rd の分離、抗体染色

3-4-3. ジンセノシド類の定量分析

ポリエーテルスルホン膜で分離したジンセノシド Rb1、Rc、Rd を上記の方法で染色する。各染色スポットを画像スキャナーによりコンピュータへ取り込み、画像解析ソフトウェア(NIH Image)を用いて数値化し、表計算ソフトにより定量値を算出する。結果を表4に示す。

また人参成分のジンセノシド Re に対しても同様にポリエーテルスルホン膜で展開・分離(展開溶媒:水 メタノール 酢酸混液)及び抗ジンセノシド Re モノクローナル抗体での染色(図10)、NIH Image を用いた定量分析を完結させた(表5)。

4. 総括

今回初めて親水性ポリエーテルスルホン膜を用いることで、薬用人参の主要な成分であるジンセノシド類を膜上で直接展開・分離できることを可能とした。これにより従来法の加熱・加圧による TLC 板から膜への全成分の転写ステップを回避し、転写効率の影響を受けない手法を見出した。Wayne Rasband が作成した NIH Image 画像解析ソフトウェアはパブリックドメインであり、誰もが簡単に利用することができる。本研究においては、各スポットについて面積を測定することで定量化を可能とした。本測定法は、各スポットを白黒画像に変換し、黒に変換した部分のみの面積を測定するだ

表4 各種人参中のジンセノシド Rb1、Rc、Rd の定量

Sample	Concentration (µg/mg dry weight powder)					
	Ginsenoside Rb1		Ginsenoside Rc		Ginsenoside Rd	
	NIH Image	HPLC	NIH Image	HPLC	NIH Image	HPLC
White ginseng	2.28 ± 0.08	2.47 ± 0.24	2.09 ± 0.74	2.38 ± 0.77	ND	0.37 ± 0.03
Red ginseng	3.51 ± 0.15	2.72 ± 0.17	2.25 ± 0.40	2.43 ± 0.15	1.18 ± 0.12	0.40 ± 0.04
Fibrous ginseng	16.94 ± 0.32	13.10 ± 0.05	19.73 ± 2.48	19.39 ± 1.49	8.15 ± 2.55	4.69 ± 0.03
<i>P. notoginseng</i>	14.35 ± 0.64	14.91 ± 0.80	ND	3.81 ± 0.92	5.01 ± 0.30	4.46 ± 0.18
<i>P. quinquefolium</i>	12.92 ± 0.15	11.53 ± 0.54	4.73 ± 1.48	6.01 ± 0.58	3.12 ± 0.54	2.24 ± 0.16
<i>P. japonicus</i>	2.62 ± 0.33	0.79 ± 0.19	ND	ND	ND	ND

Data are the means of triplicate assays. ND= not detectable.

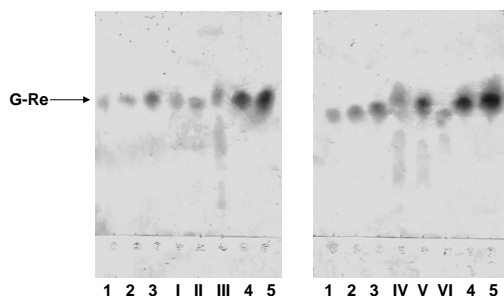


図10 各種人参中のジンセノシド Re の分離、抗体染色

表5 各種人参中のジンセノシド Re の定量

Sample	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mg}$ dry wt. powder)	
	NIH Image	HPLC
White ginseng	1.84 ± 0.58	1.23 ± 0.10
Red ginseng	1.82 ± 0.57	1.16 ± 0.09
Fibrous ginseng	8.28 ± 0.11	8.68 ± 0.70
<i>P. notoginseng</i>	3.58 ± 0.06	4.23 ± 1.22
<i>P. quinquefolium</i>	16.63 ± 0.75	12.94 ± 2.26
<i>P. japonicus</i>	0.25 ± 0.02	0.66 ± 0.35

Data are the means of triplicate assays.

けである。各スポットは歪な形態をし、一定した形ではないが、NIH Image 画像解析ソフトウェアはドット単位で測定し、また測定エリアを細かく指定できることから、再現性よく測定できる利点がある。実施例に示すように各種人参中のジンセノシド類含有量を簡便に定量できる。

また、薬用人参の組織、器官等はその切片にポリエーテルスルホン膜を被うことでジンセノシド類を膜に転写させ、簡便に染色（検出）することができ、従って高含有部位の検索が極めて迅速に行える。本方法は配糖体類全般にわたり応用可能な技術であり幅広い応用面が考えられる。人参は大変高価であるので、ジンセノシドの抽出原料としては適切ではないが、本方法により薬理活性の強いジンセノシド含有植物のスクリーニングが容易に行え、適切な原料植物の発見が可能となる。

参考文献

- 1) Shoyama, Y., Fukada, T., Tanada, T., Kusai, A., and Nojima, K. (1993) Direct determination of opium alkaloid-bovine serum albumin conjugate by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Biol. Pharm. Bull.*, 16, 1051-1053.
- 2) Sakata, R., Shoyama, Y., and Murakami, H. (1994) Production of monoclonal antibodies and enzyme immunoassay for typical adenylate cyclase activator, Forskolin. *Cytotechnology*, 16, 101-108.
- 3) Yanagihara, H., Sakata, R., Shoyama, Y., and Murakami, H. (1996) Rapid analysis of small samples containing forskolin using monoclonal antibodies. *Planta Med.*, 62, 169-172.
- 4) Tanaka, H., Goto, Y., and Shoyama, Y. (1996) Monoclonal antibody based enzyme immunoassay for marijuana (cannabinoid) compounds. *Immunoassay*, 17, 321-342.
- 5) Shoyama, Y., Fukada, T., and Murakami, H. (1996) Production of monoclonal antibodies and ELISA for thebaine and codeine. *Cytotechnology*, 19, 55-61.
- 6) Ishiyama, M., Shoyama, Y., Murakami, H., and Shinohara, H. (1996) Production of monoclonal antibodies and development of an ELISA for solamargine. *Cytotechnology*, 18, 153-158.
- 7) Xuan, L., Tanaka, H., Xu, Y., and Shoyama, Y. (1999) Preparation of monoclonal antibody against crocin and its characterization. *Cytotechnology*, 29, 65-70.
- 8) Tanaka, H., Fukuda, N., and Shoyama, Y. (1999) Formation of monoclonal antibody against a major ginseng component, ginsenoside Rb1 and its characterization. *Cytotechnology*, 29, 115-120.
- 9) Fukuda, N., Tanaka, H., and Shoyama, Y. (2000) Formation of monoclonal antibody against a major ginseng component, ginsenoside Rg1 and its characterization. *Cytotechnology*, 34, 197-204.
- 10) Morinaga, O., Tanaka, H., and Shoyama, Y. (2006) Enzyme-linked immunosorbent assay

- for the detection of total ginsenosides in ginseng, *Analytical Letters*, 39, 287–296.
- 11) Tanaka, H., and Shoyama, Y. (1998) Formation of a monoclonal antibody against glycyrrhizin and development of an ELISA. *Biol.Pharm. Bull.*, 21, 1391–1393.
 - 12) Zhu, SH., Shimokawa, S., Tanaka, H., and Shoyama, Y. (2004) Development of an assay system for saikosaponin a using anti-saikosaponin a monoclonal antibodies. *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 66–71.
 - 13) Zhu, SH., Shimokawa, S., Tanaka, H., and Shoyama, Y. (2006) A novel analytical ELISA -based methodology for pharmacologically active saikosaponins. *Fitoterapia*, 77, 100–108.
 - 14) Morinaga, O., Tanaka, H., and Shoyama, Y. (2000) Production of monoclonal antibody against a major purgative component, sennoside A, its characterization and ELISA. *Analyst*, 125, 1109–1113.
 - 15) Morinaga, O., Nakajima, S., Tanaka, H., and Shoyama, Y. (2001) Production of monoclonal antibodies against a major purgative component, sennoside B, their characterization and use in ELISA. *Analyst*, 126, 1372–1376.
 - 16) Lu, Z., Morinaga, O., Tanaka, H., and Shoyama, Y. (2003) A quantitative ELISA using monoclonal antibody to survey paeoniflorin and albiflorin in crude drugs and traditional Chinese herbal medicines. *Biol. Pharm. Bull.*, 26, 862–866.
 - 17) Kim, JS., Tanaka, H., and Shoyama, Y. (2004) Immunoquantitative analysis for berberine and its related compounds using monoclonal antibodies in herbal medicines. *Analyst*, 129, 87–91.
 - 18) Granger, S. M., Lloubes, R., Murcia, G., and Schnarr, M. (1988) Specific protein - DNA complexes: immunodetection of the protein component after gel electrophoresis and Western blotting. *Anal. Biochem.*, 174, 235–238.
 - 19) Reig, J. A., and Klein, D. C. (1988) Sub-microgram quantities of unstained proteins are visualized on polyvinylidene difluoride membranes by transillumination. *Appl. Theor. Electrophor.*, 1, 59–60.
 - 20) Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350–4354.
 - 21) Towbin, H., Schoenenberger, C., Ball, R., Braun, D. G., and Rosenfelder, G. (1984) Glycosphingolipid-blotting: an immunological detection procedure after separation by thin layer chromatography. *J. Immunol. Methods*, 72, 471–479.
 - 22) Uemura, K., Childs, R. A., Hanfland, P., and Feizi, T. (1983) A multiplicity of erythrocyte glycolipids of the neolacto series revealed by immuno - thin - layer chromatography with monoclonal anti-I and anti-i antibodies. *Biosci. Rep.*, 3, 577–588.
 - 23) Kundu, S. K., Pleatman, M. A., Redwine, W. A., Boyd, A. E., and Marcus, D. M. (1983) Binding of monoclonal antibody A2B5 to gangliosides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 116, 836–842.
 - 24) Suetake, K., and Yu, R. K. (2003) Thin-layer chromatography; immunostaining of glycolipid antigens ; and interpretation of false - positive findings with acidic lipids. *Methods Enzymol.*, 363, 312–319.
 - 25) Meisen, I., Peter-Katalinic, J., and Muthing, J. (2004) Direct analysis of silica gel extracts from immunostained glycosphingolipids by nanoelectrospray ionization quadrupole time - of - flight mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 76, 2248–2255.
 - 26) Miyamoto, T., Yamamoto, A., Sakai, M., Tanaka, H., Shoyama, Y., and Higuchi, R. (2006) Immunochemical studies of starfish gangliosides : production of monoclonal antibody against AG-2, the major ganglioside of starfish *Acanthaster planci*, and detecting its distribution in tissue by TLC immunostaining. *J. Marine Biotechnology*, 1, 298–304.
 - 27) Tanaka, H., Putalun, W., Tsuzaki, C., and Shoyama, Y. (1997) A simple determination of steroidal alkaloid glycosides by thin - layer chromatography immunostaining using mono-

- clonal antibody against solamargine. *FEBS Lett.*, 404, 279–282.
- 28) Shan, S.J., Tanaka, H., and Shoyama, Y. (2001) Enzyme-linked immunosorbent assay for glycyrrhizin using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody and an eastern blotting technique for glucuronides of glycyrrhetic acid. *Anal. Chem.*, 73, 5784–5790.
- 29) Fukuda, N., Tanaka, H., and Shoyama, Y. (1999) Western blotting for ginseng saponins, ginsenosides using anti-ginsenoside Rb1 monoclonal antibody. *Biol. Pharm. Bull.*, 22, 219–220.
- 30) Zhu, S., Morinaga, O., Shimokawa, S., Shon, T.K., Lee, S.C., Shoyama, Y., and Tanaka, H. (2007) Eastern blotting and use of anti-saikosaponin a monoclonal antibodies for detection of saikosaponins, *J. Nat. Med.*, 61, 178–183.
- 31) Morinaga, O., Fukuda, N., Tanaka, H., and Shoyama, Y. (2005) Chromatographic resolution of glucosidic compounds, ginsenosides on polyethersulphone membrane, and its application to the quantitative immunoassay for ginseng saponins. *Glycobiology*, 15, 1061–1066.
- 32) Morinaga, O., Fujino, A., Tanaka, H., and Shoyama, Y. (2005) An on-membrane quantitative analysis system for glycyrrhizin in licorice roots and traditional Chinese medicines, *Anal Bioanal. Chem.*, 383, 668–672.
- 33) Morinaga, O., Tanaka, H., and Shoyama, Y. (2006) Detection and quantification of ginsenoside Re in ginseng samples by a chromatographic immunostaining method using monoclonal antibody against ginsenoside Re. *J. Chromatogr. B*, 830, 100–104.
- 34) Morinaga, O., Zhu, S., Tanaka, H., and Shoyama, Y. (2006) Visual detection of saikosaponins by on-membrane immunoassay and estimation of traditional Chinese medicines containing Bupleuri radix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 346, 687–692.
- 35) 正山征洋, 森永 紀 (2006) 配糖体の分析方法, 特願 2004-140287