

(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 - 119279

(P2002 - 119279A)

(43)公開日 平成14年4月23日(2002.4.23)

(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 D319/24	4 B 0 2 4
C 0 7 D319/24		C 0 7 K 16/44	4 B 0 5 0
C 0 7 K 16/44		C 1 2 N 9/08	4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10		9/38	4 B 0 6 5
9/08		C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 24 O L (全 13数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 315948(P2000 - 315948)

(22)出願日 平成12年10月16日(2000.10.16)

(71)出願人 500481031

財団法人食品薬品安全センター
東京都港区虎ノ門一丁目15番12号

(72)発明者 松木 容彦

神奈川県秦野市落合729 - 5 財団法人食品
薬品安全センター 秦野研究所内

(72)発明者 神戸川 明

東京都狛江市市元和泉3 - 8 - 5 神戸川研究所
内

(74)代理人 100089314

弁理士 大多和 明敏 (外1名)

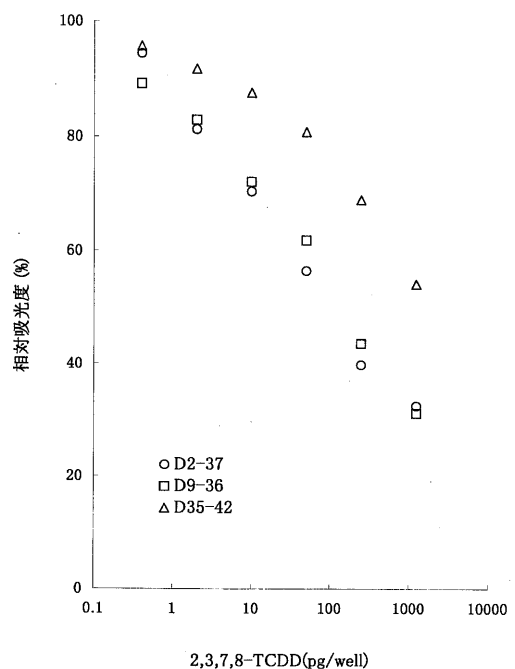
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ダイオキシンに対するモノクローナル抗体及びその用途

(57)【要約】

【課題】ヒトの生体試料中ダイオキシン類の簡易かつ高感度な酵素イムノアッセイ法を確立する。

【解決手段】ダイオキシン類の1又はそれ以上に特異的であるモノクローナル抗体であって、ダイオキシン類の内、2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシンに親和性が最大であるモノクローナル抗体により、ヒトの生体試料中のダイオキシン類を酵素イムノアッセイ法により検出、測定する。



(図4) 2,3,7,8-TCDD の標準曲線

【特許請求の範囲】

【請求項1】ダイオキシン類の1又はそれ以上に特異的であるモノクローナル抗体であって、ダイオキシン類の内、2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシンに親和性が最大であるモノクローナル抗体。

【請求項2】ダイオキシン類が、ポリハロゲン化ジベンゾ-p-ダイオキシン又はポリハロゲン化ジベンゾフランである請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】ダイオキシン類が、下記(1)~(7)のポリハロゲン化-p-ダイオキシン又は下記(8)~(17)のポリハロゲン化ジベンゾフランである請求項1又は2記載のモノクローナル抗体。

(1) 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン(2378TCDD)、(2) 1,2,3,7,8-ペンタクロロジベンゾ-p-ダイオキシン(12378PeCDD)、(3) 1,2,3,4,7,8-ヘキサクロロジベンゾ-p-ダイオキシン(123478HxCDD)、(4) 1,2,3,6,7,8-ヘキサクロロジベンゾ-p-ダイオキシン(123678HxCDD)、(5) 1,2,3,7,8,9-ヘキサクロロジベンゾ-p-ダイオキシン(123789HxCDD)、(6) 1,2,3,4,6,7,8-ヘプタクロロジベンゾ-p-ダイオキシン(1234678HpCDD)、(7) 1,2,3,4,6,7,8,9-オクタクロロジベンゾ-p-ダイオキシン(12346789OCDD)、(8) 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾフラン(2378TCDF)、(9) 1,2,3,7,8-ペンタクロロジベンゾフラン(12378PeCDF)、(10) 2,3,4,7,8-ペンタクロロジベンゾフラン(23478PeCDF)、(11) 1,2,3,4,7,8-ヘキサクロロジベンゾフラン(123478HxCDF)、(12) 1,2,3,6,7,8-ヘキサクロロジベンゾフラン(123678HxCDF)、(13) 1,2,3,7,8,9-ヘキサクロロジベンゾフラン(123789HxCDF)、(14) 2,3,4,6,7,8-ヘキサクロロジベンゾフラン(234678HxCDF)、(15) 1,2,3,4,6,7,8-ヘプタクロロジベンゾフラン(1234678HpCDF)、(16) 1,2,3,4,7,8,9-ヘプタクロロジベンゾフラン(1234789HpCDF)、(17) 1,2,3,4,6,7,8,9-オクタクロロジベンゾフラン(12346789OCDF)。

【請求項4】更に、(2)、(8)または(10)との親和性が大である請求項3記載のモノクローナル抗体。

【請求項5】(1)との親和性を1.0とした場合、(2)、(10)との交差率が0.5前後である請求項4記載のモノクローナル抗体。

【請求項6】(1)との親和性を1.0とした場合、(2)との交差率が0.2前後、(8)、(10)との*

*交差率が0.3前後である請求項4記載のモノクローナル抗体。

【請求項7】(1)との親和性を1.0とした場合、(2)との交差率が1.0前後である請求項4記載のモノクローナル抗体。

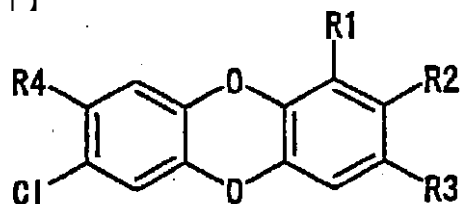
【請求項8】ハイブリドーマD9-36(FERM P-18057)から生産されるものである請求項5記載のモノクローナル抗体。

【請求項9】ハイブリドーマD2-37(FERM P-18056)から生産されるものである請求項6記載のモノクローナル抗体。

【請求項10】ハイブリドーマD35-42(FERM P-18058)から生産されるものである請求項7記載のモノクローナル抗体。

【請求項11】以下の式で表わされるハプテンと蛋白との結合物で動物を免疫し、該動物から抗体製造細胞を得、前記細胞を腫瘍細胞と融合させて複数のハイブリドーマ(混合種)を生成させ、該複数のハイブリドーマからダイオキシン類と反応する抗体を製造する少なくとも1種のハイブリドーマを選択し、該ハイブリドーマから製造された抗体類を回収することを特徴とする、請求項1、2、3、4、5、6又は7記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【化1】



式中、R1はNHCO(CH₂)₂COOH、NHCO(CH₂)₃COOH、NHCO(CH₂)₄COOH、NHCOCH=CHCOOH、CH=CHCOOH、CH=C(CH₃)COOH、(CH=CH)₂COOH、Hから選ばれる官能基であり、R2はH、Cl、OCH₂COOH、O(CH₂)₃COOH、O(CH₂)₄COOH、CH=CHCOOH、(CH=CH)₂COOHから選ばれる官能基であり、R3はClまたはHであり、R4はCl、CH₃またはC(CH₃)₃である。

【請求項12】請求項11で用いるハプテン-蛋白結合物における蛋白がウシ血清アルブミン、卵白アルブミン、スカシ貝ヘモシアニンである請求項11記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項13】ハイブリドーマがD9-36(FERM P-18057)、D2-37(FERM P-18056)又はD35-42(FERM P-18058)である、請求項11記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項14】請求項11において得られる、請求項1、2、3、4、5、6又は7記載のモノクローナル抗

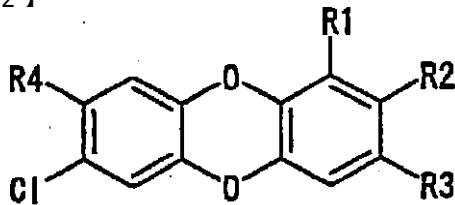
体を産生するハイブリドーマ。

【請求項15】D9-36(FERM P-18057)、D2-37(FERM P-18056)又はD35-42(FERM P-18058)である、請求項14記載のハイブリドーマ。

【請求項16】請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9または10記載のモノクローナル抗体を用いる免疫酵素測定法によるダイオキシン類の検出、測定方法。

【請求項17】以下の式で表わされるハプテンと酵素とを結合させた、ダイオキシン類のアッセイ系に用いる酵素標識ハプテン。

【化2】



式中、R1はNHCO(CH₂)₂COOH、NHCO(CH₂)₃COOH、NHCO(CH₂)₄COOH、N 20
HCOCH=CHCOOH、CH=CHCOOH、CH=C(CH₃)COOH、(CH=CH)₂COOH、Hから選ばれる官能基であり、R2はH、Cl、OCH₂COOH、O(CH₂)₃COOH、O(CH₂)₄COOH、CH=CHCOOH、(CH=CH)₂COOHから選ばれる官能基であり、R3はClまたはHであり、R4はCl、CH₃またはC(CH₃)₃である。

【請求項18】酵素が西洋ワサビペルオキシダーゼ、
-ガラクトシダーゼである請求項17記載の酵素標識ハ
プテン。

【請求項19】1)(1)請求項1、2、3、4、5、
6、7、8、9または10記載のモノクローナル抗体
に対する抗体を固定化した固相、(2)請求項1、2、
3、4、5、6、7、8、9または10記載のモノク
ローナル抗体、(3)ダイオキシン類を含む試料と(4)
請求項17記載の酵素標識ハプテンとを反応させ、
2)固相に固定化された標識酵素活性を測定すること
により試料中のダイオキシン類の濃度を測定するこ
とを特徴とする、請求項16記載のダイオキシン類の
検出、測定方法。

【請求項20】1)(1)請求項1、2、3、4、5、
6、7、8、9または10記載のモノクローナル抗体
を固定化した固相、(2)ダイオキシン類を含む試料
と(3)請求項17記載の酵素標識ハプテンとを反応
させ、
2)固相に固定化された標識酵素活性を測定するこ
とにより試料中のダイオキシン類の濃度を測定する
ことを特徴とする、請求項16記載のダイオキシン
類の検出、測定方法。

【請求項21】ダイオキシンの高純度化に用いる組成物 50

であって、請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9
または10記載のモノクローナル抗体を含んでなる組
成物。

【請求項22】ダイオキシンの生化学的、免疫学的、機
能的、又はその他の研究分析法で用いる組成物であ
って、有効量の請求項1、2、3、4、5、6、7、8、
9または10記載のモノクローナル抗体を含んでなる組
成物。

【請求項23】試料中のダイオキシン類の存在又は濃度
の測定用キットであって、請求項1、2、3、4、5、
6、7、8、9または10記載のモノクローナル抗体、
請求項17記載の酵素標識ハプテンを含有するキット。

【請求項24】請求項1、2、3、4、5、6、7、
8、9または10記載のモノクローナル抗体に対する抗
体、請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9または
10記載のモノクローナル抗体、請求項17記載の酵素
標識ハプテンを含有する試料中のダイオキシン類の存在
又は濃度の測定用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はダイオキシン類に対
するモノクローナル抗体、特にダイオキシン類の内、
2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキ
シンに親和性が最大であるモノクローナル抗体に関する
ものである。本発明は又、該モノクローナル抗体の製造
法、該モノクローナル抗体を用いるダイオキシン類の検
出、測定法、そのためのキットに関するものである。

【0002】

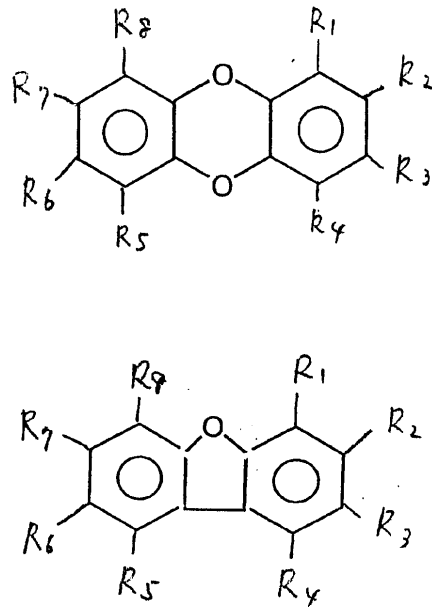
【従来の技術】近年、化学物質による環境汚染とそれら
のヒト健康への影響の懸念から、大気、焼却灰、排ガ
ス、排水、常水、食物等に含まれるダイオキシンにつ
いては、日本のみならず世界各国においても社会関心事
であり、環境汚染物としてのダイオキシン類が生物、人
類に対して及ぼす持続性の毒性の脅威が言われている。
ダイオキシン類は廃棄物の熱を伴う処理過程や有機塩素
化合物の生産過程等で生成する非意図的な化学物質で
あるが、発生源が多岐にわたり、その環境汚染が大きな
問題となってきたため、これらによるヒトでの曝露、
生態系や食物の汚染状況を調査することは急務となっ
ている。
ダイオキシン類の発生毒性は生体の毒性に比べて感受
性が高いうえ、その影響は多くの場合不可逆的でも次
世代に及ぶという大きな問題がある。なかでも妊娠中
及び授乳中の母親が曝露されることによる子への影響
は非常に低濃度のダイオキシンによっても現れる可
能性があるため、その被曝量を的確かつ迅速にモニタ
ーし得る微量定量法の確立が切望されている。多
種類の汚染物質が混在している試料について特定の
ダイオキシン類を高感度、高精度で測定するには、
従来、高分解能ガスクロマトグラフィー/マス
スペクトロメトリー(HRGS/HRMS)が用いられて
きた。しかし、HRGS/HRM

Sで測定するには、どの試料においても他段階で煩雑なクリーンアップ操作を要し、良く整備された実験室で高価な装置を用い、熟達した研究者が長時間に亘って作業する必要があるため、その費用は著しく高価なものとなっている。今後、ダイオキシン類の測定対象試料種や数は益々増加することが予測されることから、安価で簡便かつ高感度な測定法の開発が強く望まれている。このHRGS/HRMSに代る方法の一つに免疫測定法がある。この方法によるダイオキシンの測定はいくつか報告されているが、高濃度のダイオキシンを含む試料（環境試料や標準溶液）についてであり（Kennel, S.J.ら、Toxicol. Appl. Pharmacol. 1986, 82, 256-263; Stanker, L. H.ら、Toxicology. 1987, 45, 229-243; Vanderlaan, M.ら、Toxicol. Chem. 1988, 7, 859-870; Sugawara, Y.ら、Anal. Chem. 1998, 70, 1092-1099; Sanborn, J.R.ら、J. Agric. Food Chem. 1988, 46, 2407-2416; Harrison, R.O.ら、Organohalogen Compounds 1999, 36, 129-132; Zenn*

*egg, M.ら、Organohalogen Compounds 1999, 36, 317-319)、測定が求められているヒト母乳や血液などダイオキシン含量の低い生体試料についてはほとんど報告がない。

【0003】ダイオキシン類について更に説明すると、ダイオキシン類は以下の式(a)に示すダイオキシン〔ポリ塩化ジベンゾ-p-ジオキシン(PCDDs)〕および式(b)に示すポリ塩化ジベンゾフラン(PCDFs)を指すが、これらは3環性塩素化合物で、置換塩素の数や位置の違いにより多くの構造異性体が存在し、各々、生物学的作用や物理化学的性質は類似しているものや全く異なるものがあり、各異性体で毒性も著しく変ってくる。このように毒性が異性体や同族体間で大きく異なるので、実測濃度で毒性を評価することは困難である。

【化3】



R₁ ~ R₈ : HまたはCl

但し全てがHである場合を除く。

【0004】ダイオキシン類の構造異性体には75種のポリ塩化ジベンゾ-p-ジオキシン(PCDDs)と135種のポリ塩化ジベンゾフラン(PCDFs)があるが、各異性体間の毒性は大きく相違するため、最も毒性の強い2,3,7,8-TCDDに対する毒性を1としたときの相対毒性、毒性等価係数(Toxic Equivalency Factor; TEF)が提唱され、毒性の強い7種のPCDDsおよび10種のPCDFsが測定対象とされている。また、以前から環境中の汚染物質として知られていたポリ塩化ビフェニール(PCBs)のうち4種のノンオルトPCBsと8種のモノ

オルトPCBsもダイオキシンと同様の生物作用を示す化合物として測定されているようになってきた。そこで、ダイオキシン類の評価には、各異性体の実測濃度にTEFを乗じた値の総和を2,3,7,8-TCDD毒性等価量(Toxic Equivalent quantity; TEQ)に換算し、この値を用いて毒性評価が行われる。

【0005】ごく最近になって母乳中のダイオキシン類のTEQの大部分は、(1)2,3,7,8-TCDD、(2)1,2,3,7,8-PeCDDおよび(10)2,3,4,7,8-PeCDFの3種で占められ

ていることが明らかになり、これらに親和性の高い抗体を用いる酵素イムノアッセイ (ELISA) でダイオキシン類の毒性を評価できることが示された (Nakazawa, H.ら、Organohalogen Compounds 2000,45,86-89; Saito, K.ら、Organohalogen Compounds 2000,45,168-171; Sugawara, Y.ら、Organohalogen Compounds 2000,45,172-175)。しかし、ここで用いた抗体はウサギのポリクローナル抗体であるため、産生もしくは入手時のロット差のない抗体を大量に供給することは不可能であり、その測定法ならびに測定結果の安定性、普遍性に問題があった。また、同一ロットの抗血清を用いても、反応に關与する抗体種 (クロノタイプ) が複数混在するため、測定試料によっては反応する抗体種が異なり、測定値が変動する場合もある。上記のポリクローナル抗体を用いる方法の欠点を改良すべく、ダイオキシン類に対するモノクローナル抗体やそれを用いるダイオキシン類の測定法も提案されている〔特開昭63-14691号公報 (USP4,798,807号)、特開昭63-74494号公報参照〕。しかしながらこれらのモノクローナル抗体はダイオキシン類に対する特異性、抗ダイオキシン抗体価に関する情報が不明確であり、測定法としては、特開昭63-74494号公報記載のものは、他のダイオキシン同族体との交差反応性が示されていないので、この抗体を使って求めた測定結果を毒性の観点からは評価することができないし、特開昭63-14691号のものは、毒性の最も強い2,3,7,8-TCDDより他のダイオキシン同族体に親和性が高いため、同族体の混合比が異なる実試料の測定値は毒性等価量と相関しないという欠点がある他、両者とも2,3,7,8-TCDDの定量限界が1ng前後であり、生体試料など微量のダイオキシンを含む実試料の定量には使用できない、等で問題があり実用性に欠けるものであった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明はヒトの生体試料中のダイオキシン類の簡易かつ高感度な酵素イムノアッセイ法 (ELISA) を確立し、特にヒトでのダイオキシンによる汚染のモニタリングや状況調査に資する方法を提供することを目的とし、そのために適したモノクローナル抗体を提供することを課題とするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】中澤らは、ELISA法による測定対象の選択とその適切性について確認するため、HRGC/MSにより測定し得られたヒト母乳中のダイオキシンの同族体の各測定結果と毒性等価係数 (TEF) をもとに算出した毒性等価量 (TEQ) との相関性について調べた。その結果、特に (2) 1, 2, 3, 7, 8 - PeCDD と (10) 2, 3, 4, 7, 8 - PeCDF の2種が特にTEQとの相関が優れており、TEFの高い2, 3, 7, 8 - TCDDを含めた3種をE

LISAで測定できれば、毒性等量換算値としてのヒトでのダイオキシン曝露評価ができることが確認された。本発明者らは上記3種に特異的なモノクローナル抗体を得るべく研究を重ねた結果、ダイオキシン類中2, 3, 7, 8 - TCDDに最大の親和性を有する新規なモノクローナル抗体を得ることに成功し、本発明に到達したものである。

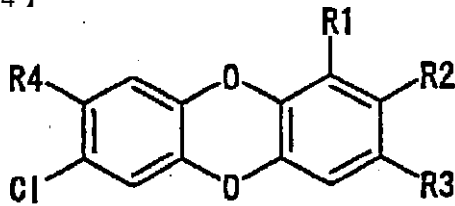
【0008】即ち、本発明はダイオキシン類の1又はそれ以上に特異的であるモノクローナル抗体であって、ダイオキシン類の内、2, 3, 7, 8 - テトラクロロジベンゾ - p - ダイオキシンに親和性が最大であるモノクローナル抗体に関するものである。本発明においてダイオキシン類とは、ポリハロゲン化ジベンゾ - p - ダイオキシン又はポリハロゲン化ジベンゾフランを指し、これらの具体例としては、下記(1) ~ (7)のポリハロゲン化 - p - ダイオキシン又は下記(8) ~ (17)のポリハロゲン化ジベンゾフランがあげられる。

(1) 2, 3, 7, 8 - テトラクロロジベンゾ - p - ダイオキシン (2378TCDD)、(2) 1, 2, 3, 7, 8 - ペンタクロロジベンゾ - p - ダイオキシン (12378PeCDD)、(3) 1, 2, 3, 4, 7, 8 - ヘキサクロロジベンゾ - p - ダイオキシン (123478HxCDD)、(4) 1, 2, 3, 6, 7, 8 - ヘキサクロロジベンゾ - p - ダイオキシン (123678HxCDD)、(5) 1, 2, 3, 7, 8, 9 - ヘキサクロロジベンゾ - p - ダイオキシン (123789HxCDD)、(6) 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 - ヘプタクロロジベンゾ - p - ダイオキシン (1234678HpCDD)、(7) 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 - オクタクロロジベンゾ - p - ダイオキシン (12346789OCDD)、(8) 2, 3, 7, 8 - テトラクロロジベンゾフラン (2378TCDF)、(9) 1, 2, 3, 7, 8 - ペンタクロロジベンゾフラン (12378PeCDF)、(10) 2, 3, 4, 7, 8 - ペンタクロロジベンゾフラン (23478PeCDF)、(11) 1, 2, 3, 4, 7, 8 - ヘキサクロロジベンゾフラン (123478HxCDF)、(12) 1, 2, 3, 6, 7, 8 - ヘキサクロロジベンゾフラン (123678HxCDF)、(13) 1, 2, 3, 7, 8, 9 - ヘキサクロロジベンゾフラン (123789HxCDF)、(14) 2, 3, 4, 6, 7, 8 - ヘキサクロロジベンゾフラン (234678HxCDF)、(15) 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 - ヘプタクロロジベンゾフラン (1234678HpCDF)、(16) 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 - ヘプタクロロジベンゾフラン (1234789HpCDF)、(17) 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 - オクタクロロジベンゾフラン (12346789OCDF)。本発明は(1)の2, 3, 7, 8 - テトラクロロジベンゾ - p - ダイオキシンに最大の親和性を有し、更に(2)の1, 2, 3, 7,

8 - ペンタクロロジベンゾ - p - ダイオキシン、(8) の 2 , 3 , 7 , 8 - テトラクロロジベンゾフラン、及び / 又は (10) の 2 , 3 , 4 , 7 , 8 - ペンタクロロジベンゾフランとの親和性が大であるモノクローナル抗体を提供するものである。本発明はまたハイブリドーマ D 9 - 3 6 (F E R M P - 1 8 0 5 7)、ハイブリドーマ D 2 - 3 7 (F E R M P - 1 8 0 5 6) またはハイブリドーマ D 3 5 - 4 2 (F E R M P - 1 8 0 5 8) から生産されるモノクローナル抗体を提供するものである。

【 0 0 0 9 】本発明は又、以下の式で表わされるハプテンと蛋白との結合物で動物を免疫させ、該動物から抗体製造細胞を得、前記細胞を腫瘍細胞と融合させて複数のハイブリドーマを生成させ、該複数のハイブリドーマからダイオキシン類と反応する抗体を製造する少なくとも 1 種のハイブリドーマを選択し、該ハイブリドーマから製造された抗体類を回収することを特徴とする、モノクローナル抗体の製造方法に関するものである。

【化 4】



式中、R 1 は NHCO (CH₂)₂ COOH、NHCO (CH₂)₃ COOH、NHCO (CH₂)₄ COOH、NHCOCH = CHCOOH、CH = CHCOOH、CH = C (CH₃) COOH、(CH = CH)₂ COOH、H から選ばれる官能基であり、R 2 は H、Cl、OCH₂ COOH、O (CH₂)₃ COOH、O (CH₂)₄ COOH、CH = CHCOOH、(CH = CH)₂ COOH から選ばれる官能基であり、R 3 は Cl または H であり、R 4 は Cl、CH₃ または C (CH₃)₃ である。上記ハプテンと結合させる蛋白としては、ウシ血清アルブミン、卵白アルブミン、スカシ貝ヘモシアニン等が挙げられる。また本発明は上記のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマに関し、特に D 9 - 3 6 (F E R M P - 1 8 0 5 7)、D 2 - 3 7 (F E R M P - 1 8 0 5 6) 又は D 3 5 - 4 2 (F E R M P - 1 8 0 5 8) で表わされるハイブリドーマに関するものである。更に、本発明は本発明のモノクローナル抗体を用いる免疫酵素測定法によるダイオキシン類の検出、測定方法、本発明のモノクローナル抗体を含有するダイオキシンの高純度化組成物、本発明のモノクローナル抗体を含有するダイオキシンの生化学的、免疫学的、機能的、又はその他の研究分析法で用いる組成物に関するものである。また本発明のモノクローナル抗体、酵素標識ハプテンを含有する試料中のダイオキシン類の存在又は濃度の測定用キットに関するものである。本発明のモノクローナル抗

体類は、試料中に含有されているダイオキシン類の同定のために用いることができ、試料中のダイオキシン類の濃度測定に用いることができる。対象試料としては、土壌、水、大気や飛灰等の環境試料及び血液や母乳等の生体試料等を挙げることができる。

【 0 0 1 0 】ダイオキシン類の存在又は濃度を測定するための種々の免疫分析法における試薬として用いた場合、本発明のモノクローナル抗体類の使用により分析法は改善される。検出はより便利に、また迅速、鋭敏になると共に、特異性が高くなる。本発明のモノクローナル抗体類を使用できる免疫分析法としては、ラジオイムノアッセイ (R I A) (放射線免疫分析)、競合免疫沈殿分析、酵素連結免疫吸着分析 (E L I S A) 及び免疫蛍光分析を挙げることができるが、これらの免疫分析法のみに限定されるものではない。本発明では特に免疫酵素測定法に用いるのが好ましく、その際、擬似抗原を固定し、試料中のダイオキシン類とモノクローナル抗体との反応を競合させる間接競合法と、抗体を固定し試料中のダイオキシン類と酵素標識ハプテンとの反応割合を見る直接競合法とが挙げられる。後者では抗体として本発明のモノクローナル抗体を用いることもできるが、マウス I g G に対する第 2 次抗体を固定し、試料、モノクローナル抗体、酵素標識ハプテンと接触させる方法が、その再現性、簡便性、感度等の点ですぐれていて好ましい。ハプテンを標識するための酵素としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 - ガラクトシダーゼ等が挙げられる。

【 0 0 1 1 】試料中のダイオキシン類の存在又は濃度を検定ないし測定する本発明による組成物は、化学物質の存在を検出するために有効な濃度の抗体又は化学物質量の定量をするために有効な濃度の抗体を含有している。ラテックス粒子又はプラスチック・マイクロタイター・プレートのような適当な担体と抗体とを混合又は抗体をこれらの担体に付着させておいてもよい。用いる免疫学的方法に応じて、抗体に酵素もしくは色素を配合することもでき、放射能標識を付すこともできる。従って、2 , 3 , 7 , 8 - T C D D を含むダイオキシン類と反応するモノクローナル抗体類を用いる分析法は全て本発明の技術的範囲に包含される。本発明のモノクローナル抗体類は、選択的免疫反応に基づいて、複雑な混合物又は溶液からダイオキシン類を測定、単離、純化及び / 又は、除去するために使用できる。ダイオキシン類と反応するモノクローナル抗体の使用により、従来法は著しく改良される。これらのモノクローナル抗体類を上記の反応に用いて有用性が発揮される特性は、ポリクローナル抗体類と比較した場合に認められる顕著な特異性と、大規模な工業的ないし商業的な規模での均質な抗体の使用を可能にし、実際上量的に制限なく入手できることである。

【 0 0 1 2 】たとえば本発明のモノクローナル抗体を用

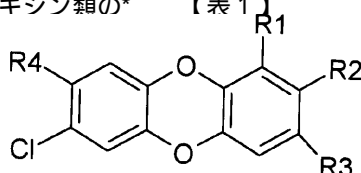
いて、その他のダイオキシン類又は類似有機化合物類の混合物から例えば2, 3, 7, 8 - TCDDを分離し純化することができる。混合物を、固定化された本発明のモノクローナル抗体と接触させると、抗体の結合した2, 3, 7, 8 - TCDDの固定複合体が形成されて2, 3, 7, 8 - TCDDが混合物から分離されて、混合物を除去した後、2, 3, 7, 8 - TCDDを抗体から分離し、公知の技術により高純度のものを回収する。複雑な混合物からダイオキシン類を純化ないし回収するために用いる本発明による組成物は、許容できる器材上10に固定するか或いは許容できる担体と混合させて、ダイオキシン類との反応及び結合が可能な状態の有効量の本発明のモノクローナル抗体を含有する。本発明のモノクローナル抗体類は、ダイオキシン類の構造及び作用機能に関係した研究のための有用な試薬でもある。本発明の抗体類の持つ鋭敏な特異性のために、ダイオキシン類の*

*免疫化学的分析及び構造活性分析に使用することが可能になり、特異性に乏しい従来法のポリクローナル抗体類と比較して上記の如き応用により適したものとなる。研究試薬として使用する本発明による組成物は、ダイオキシン類との混合及びそれに続く分析によって情報を提供する効果を発揮する量の抗体を含有する。その量については適宜決めることができるものである。

【0013】本発明の新規モノクローナル抗体の作製とELISA法の構築について更に詳しく述べると以下の通りである。

1) ハプテン抗原、タンパク結合物および標識体の合成
 ダイオキシン骨格のC - 1またはC - 2に、末端にカルボキシル基を有し、酸アミド、エーテルあるいは二重結合を介した長さの異なるスペーサーを導入した表1に示すハプテン抗原を十数種合成した。

【表1】



ハプテン	R1	R2	R3	R4
I - 1	NHCO(CH ₂) ₂ COOH	H	Cl	Cl
I - 2	NHCO(CH ₂) ₃ COOH	H	Cl	Cl
I - 3	NHCO(CH ₂) ₄ COOH	H	Cl	Cl
I - 4	NHCOCH=CHCOOH	H	Cl	Cl
I - 5	CH=CHCOOH	Cl	Cl	Cl
I - 6	CH=C(CH ₃)COOH	Cl	Cl	Cl
I - 7	NHCO(CH ₂) ₂ COOH	Cl	Cl	Cl
I - 8	NHCO(CH ₂) ₃ COOH	Cl	Cl	Cl
I - 9	NHCO(CH ₂) ₄ COOH	Cl	Cl	Cl
I - 10	(CH=CH) ₂ COOH	Cl	Cl	Cl
II - 1	H	OCH ₂ COOH	Cl	Cl
II - 2	H	O(CH ₂) ₃ COOH	Cl	Cl
II - 3	H	O(CH ₂) ₄ COOH	Cl	Cl
II - 4	H	CH=CHCOOH	Cl	Cl
II - 5	H	(CH=CH) ₂ COOH	Cl	Cl
II - 6	H	CH=CHCOOH	H	Cl
II - 6M	H	CH=CHCOOH	H	CH ₃
II - 6B	H	CH=CHCOOH	H	C(CH ₃) ₃

これらの中から数種のハプテンを選び、活性エステル法によりウシ血清アルブミン(BSA)との結合物を、また一方、西洋ペルオキシダーゼ(HRP)と反応させ数種の酵素標識体を得た。

【0014】2)モノクローナル抗体

ハプテン4種(I-2, I-3, I-5, II-2)のBSA結合物をBALB/c又はA/Jマウスに反復免疫投与し、血清中の抗ダイオキシン抗体価が良好な結果を与えた個体に

ついて、さらにTMDDによる阻害効果により抗体の親和力について調べた。ついで、良好な結果が得られたBALB/cマウス2匹とA/Jマウス1匹から得られた脾細胞とP3/NSI/1-Ag4-1ミエローマ細胞とをポリエチレングルコールを用いて融合し、HAT選択培養により得られた融合細胞の培養上清をELISAによりスクリーニングした。その結果、200種前後のハイブリドーマが抗ダイオキシン抗体を分泌しているこ

とが示された。

3) TMDD及び2, 3, 7, 8-TCDDによる阻害効果が大きい抗体を産生するハイブリドーマを選択し、得られたハイブリドーマをクローニングしてモノクローナル抗体を調製し、その諸性質を詳細に検討した結果、ダイオキシン類の1又はそれ以上に特異的であるモノクローナル抗体であって、ダイオキシン類の内、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシンに親和性が最大である新規なモノクローナル抗体を得ることに成功した。

本発明のモノクローナル抗体中には、更に(2)の1, 2, 3, 7, 8-ペンタクロロジベンゾ-p-ダイオキシン、(8)の2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾフラン、及び/又は(10)の2, 3, 4, 7, 8-ペンタクロロジベンゾフランとの親和性が大であるものもある。

【0015】

【実施例】I. 実験を行うにあたっての各種条件は次の通りであった。

1. 実験材料

1) ハプテン-ウシ血清アルブミン(BSA)結合体及びペルオキシダーゼ(HRP)標識ハプテン

先の表1に示した4種ハプテン(1-2, 1-3, 1-5, 11-2)のBSA結合体、及び8種ハプテン(1-2, 1-3, 1-5, 1-6, 1-7, 1-10, 11-4, 11-6)のHRP標識体を用いた。

2) マウス

BALB/c及びA/Jマウス(いずれも雌、8週齢)は、日本SLCより購入した。

3) ミエローマ細胞株

P3/NS1/1-Ag4-1 ミエローマ細胞株は、ヒューマンサイ 30
エンス研究資源バンクから供与された。

【0016】2. 試薬と器材

1) 免疫・ELISA関係

Freundの完全及び不完全アジュバント: DIFCO 0638-60-7及び0639-60-6

アフィニティー精製ウサギ抗マウスIgG+IgM抗体(第二抗体): ジャクソン 315-005-044

1,2,7-三塩化-8-メチルダイオキシン(TMDD): Wellingt
on Laboratories

o-フェニレンジアミン二塩酸塩: Sigma P9029

30% 過酸化水素水: 和光純薬工業

ELISA用マイクロタイタープレート: 住友ベークライト
MS-9596F

2) 細胞融合関係

RPMI 1640粉末培地: GIBCO-BRL 31800-022

ウシ胎児血清(FCS): GIBCO-BRL 26140-079

ハイブリドーマクローニングファクター(HCF): IGEN
HAT Media Supplement: Sigma H0262

ポリエチレングリコール4000(PEG): Merck Art 9727

ジメチルスルホキシド(DMSO): Sigma D2650

培養フラスコ(25 cm²): 岩城硝子3100-025

培養フラスコ(75 cm²): Becton Dickinson 3824

クラスターディッシュ(96ウエル): Costar 3598

その他の塩類・有機溶媒などは、試薬特級を用いた。

3. 機器

ELISAプレートリーダー(BL 312e): Bio-Tek Instrument Inc.

4. 免疫及び試験採血

- 上記4種ハプテン(1-2, 1-3, 1-5, 11-2)のBSA結合体の各々を、以下の手順でBALB/cマウス及びA/Jマウス各5匹に繰り返し免疫投与した。ハプテン-BSA結合体(50 µg)を滅菌生理食塩水(0.1 mL)に溶解し、完全アジュバント(0.1 mL)とのエマルジョンとして、上記マウスのfoot pad(片足につき1カ所)及び背部(体毛をバリカンで除去して20カ所程度)に皮下投与した。以後、同量の免疫原を不完全アジュバントとのエマルジョンとして6~8回の追加免疫を行った。5~7回目の追加免疫より7日後に眼静脈よりヘマトクリット管を用いて試験採血(20-40 µL)した。得られた血液から常法により血清を分離し、そのHRP標識ダイオキシンとの反応性を、下記のELISA法により調べた。

【0017】5. ELISA

1) 緩衝液と基質溶液

PBS: 0.9% NaClを含む0.05 mol/L NaH₂PO₄・Na₂HPO₄ 緩衝液(pH 7.3)。

基質溶液: 0.05% o-Phenylenediamine・HCl及び0.01% 過酸化水素を含む50 mmol/Lクエン酸-酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)。

2) 第二抗体固定化プレートの調製

96穴ELISA用マイクロタイタープレートの各ウエルに、第二抗体のPBS溶液(2 µg/mL)を分注(100 µL/well)して、4 ー一夜放置。抗体溶液を吸引除去したのち、PBSでウエルを3回洗浄。BSA(0.5%)のPBS(150 µL/well)をウエルに分注して、室温で2-3時間放置。溶液を吸引除去したのち、PBSでウエルを3回洗浄して第二抗体固定化プレートを作製した。

3) ELISAの方法

- 第二抗体固定化プレートに0.1%ゼラチンを含むPBSで希釈したマウス血清、ハイブリドーマ培養液またはマウス腹水及び酵素標識ダイオキシンを添加し(阻害試験ではダイオキシンの標準溶液も添加する)(100 µL/well)、4 ー一夜放置。溶液を吸引除去したのち、PBSでウエルを3回洗浄し、基質溶液を添加し(100 µL/well)、室温で30分ないし1時間放置。3 mol/L硫酸(50 µL/well)を加えて酵素反応を停止したのち、490 nmの吸光度をプレートリーダーにより測定した。

【0018】6. 細胞融合によるモノクローナル抗体の調製

1) 培地

- 50 基本培地: 10 mmol/L HEPES-NaOH緩衝液(pH 7.3)及び

硫酸カナマイシン(0.06%)を含む RPMI-1640。
培養培地: 10 % FCS、0.05 mmol/L 2-メルカプトエタノール、2 mmol/L L-グルタミン及び 1 mmol/L ビルビン酸ナトリウムを含む基本培地。

HAT培地: 0.01 mmol/L ヒポキサンチン、16 μ mol/L チミジン及び0.4 μ mol/L アミノプテリンを含む培養培地。

HT培地: 0.01 mmol/L ヒポキサンチン、16 μ mol/L チミジンを含む培養培地。

2) PEG溶液

PEG (40 g) をダルベッコPBS (-) (50 mL) に溶解し、DMSO (10 mL)、0.1% ポリ-L-アルギニン塩酸塩溶液 (1 mL) を加えたのち、1 mol/L NaOHを用いてpHを約7.5に調整した。

3) 細胞融合

抗体価の上昇が認められたマウスに、対応する免疫原(50 μ g) の生理食塩水溶液 (0.5 mL) を腹腔内投与した。その3日後に脾臓を摘出して基本培地 (10 mL) を入れたシャーレ中で脾リンパ球をほぐし、細胞浮遊液を調製した。ステンレスメッシュを用いて組織片を除去したのち、室温で遠心 (1600 rpm、6分) し、上清を除去。ペレットに基本培地 (10 mL) を加えて細胞を懸濁させて、同条件で遠心し、上清を除去。この操作を更に1回行ったのちペレットに基本培地 (10 mL) を加えて細胞を懸濁し、その一部を用いて細胞数を計算した。上記の脾細胞浮遊液 (全量) 及びその約1/5数のミエローマ細胞を遠心管に移して室温で遠心 (1600 rpm、5分) し、上清を十分に除去したのち、ペレットに予め37 $^{\circ}$ C に加温しておいたPEG溶液 (1 mL) を1分を要して滴下した。本細胞懸濁液を1分間静かに混合したのち基本培地を3回に分けて添加し (1 mLを1分; 1 mLを1分; 8 mLを3分)、同条件で遠心。上清を除去したのちペレットをよくほぐし、10% HCFを含むHAT培地 (用いた脾細胞1 \times 10⁸個あたり50 mL) を加えて融合操作後の細胞を懸濁させた。これを、96ウエルクラスターディッシュに分注(100 μ L/well) し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂で培養した。翌日、HAT培地 (100 μ L/well) を添加し、3日目、6日目に培地の約半量を吸引除去し、HAT培地 (100 μ L/well) を新たに加えた。

【0019】4) 培養上清中の抗ダイオキシン抗体のスクリーニング

培養開始より8~10日後にハイブリドーマの培養上清の一部を採取し、0.1% BSA を含む PBS と混合して上述の第二抗体固定化 ELISA プレートに添加した。室温で1時間インキュベーションしたのち、溶液を吸引除去し、プレートをPBSで3回洗浄した。HRP標識ダイオキシン(0.1 μ g; 100 μ L) を加えて同条件でインキュベーションしたのち、同様にプレートを洗浄した。各ウエ

ルに基質溶液(100 μ L/well) を添加し、上記の方法でプレート上の HRP 活性を測定した。ダイオキシンに対する抗体を産生しているハイブリドーマの中から、TMDD (50pg/well) により抗体-HRP標識ダイオキシンの結合を阻害されたハイブリドーマを選んだ。更にその中で(1) 2,3,7,8-TCDD及び(2) 1,2,3,7,8-PeCDDでの阻害効果の大きい抗体を産生しているハイブリドーマをスクリーニングし、(1) に対する親和性の強いモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、D2-37、D9-36及びD35-42を得た。

5) クローニング法

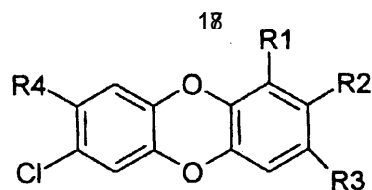
スクリーニングにより選択した各ハイブリドーマについて、限界希釈法によりクローニングを行った。ハイブリドーマを10% HCFを含むHT培地で10ヶ/mLに希釈し、96ウエルの培養プレートの各ウエルに0.2 mLずつ分注して10日間培養した。ハイブリドーマの増殖がみられるウエルについて、顕微鏡下で単一クローンであることを確認した後、抗体産生ハイブリドーマを48ウエルの培養プレートに移植して順次増殖させ、単一クローンのハイブリドーマ、D2-37、D9-36及びD35-42を得た。

【0020】6) モノクローナル抗体の特徴

上記5) で得られた3種のハイブリドーマから得られた3種のモノクローナル抗体についての毒性等価係数と交差率について図1, 2, 3に示す。交差率は2, 3, 7, 8-TCDDの検量線から算出した各同族体の2, 3, 7, 8-TCDD相当量を各同族体の添加量で除して求めた。図1~3から判るように、上記3種のモノクローナル抗体は、ダイオキシン類の中で最も毒性の強い(1) 2, 3, 7, 8-TCDDに最大の親和性を有し、また同様に毒性の強い(2) 1, 2, 3, 7, 8-PeCDD、(10) 2, 3, 4, 7, 8-PeCDFおよび/または(8) 2, 3, 7, 8-TCDFに親和性が高い。母乳など生体試料中のダイオキシン同族体含有比は個体差が小さく、前記3種(1)、(2)、(10)の同族体で全TEQ(毒性当量)の大部分を占めているため、本モノクローナル抗体を用いるELISAにより生体試料中のTEQをモニタリングすることが可能である。特に、D9-36のダイオキシン同族体との交差率はTEF(toxic equivalency factor)と近似しているため、同族体含有比の異なる試料についても適用できる可能性が有る。また、D35-42はTCDD及びPeCDDのみを認識するため、各同族体含有の大きく異なる環境試料でも前記2種の同族体を測定できる可能性がある。モノクローナル抗体の交差率は表2に示す通りである。

【0021】

【表2】



ハプテン	R1	R2	R3	R4
I-1	NHCO(CH ₂) ₂ COOH	H	Cl	Cl
I-2	NHCO(CH ₂) ₃ COOH	H	Cl	Cl
I-3	NHCO(CH ₂) ₄ COOH	H	Cl	Cl
I-4	NHCOCH=CHCOOH	H	Cl	Cl
I-5	CH=CHCOOH	Cl	Cl	Cl
I-6	CH=C(CH ₃)COOH	Cl	Cl	Cl
I-7	NHCO(CH ₂) ₂ COOH	Cl	Cl	Cl
I-8	NHCO(CH ₂) ₃ COOH	Cl	Cl	Cl
I-9	NHCO(CH ₂) ₄ COOH	Cl	Cl	Cl
I-10	(CH=CH) ₂ COOH	Cl	Cl	Cl
II-1	H	OCH ₂ COOH	Cl	Cl
II-2	H	O(CH ₂) ₃ COOH	Cl	Cl
II-3	H	O(CH ₂) ₄ COOH	Cl	Cl
II-4	H	CH=CHCOOH	Cl	Cl
II-5	H	(CH=CH) ₂ COOH	Cl	Cl
II-6	H	CH=CHCOOH	H	Cl
II-6M	H	CH=CHCOOH	H	CH ₃
II-6B	H	CH=CHCOOH	H	C(CH ₃) ₃

3つのモノクローナル抗体の特徴をまとめると以下の通りである。

D2-37：2,3,7,8-TCDDに親和性が最も高く、他の同族体との交差率が低いため、ダイオキシン類の中で最も毒性の強い2,3,7,8-TCDDを特異的かつ高感度で測定することができる。

D9-36：2,3,7,8-TCDDの他、1,2,3,7,8-PeCDDおよび2,3,4,7,8-PeCDFにも親和性が高いため、母乳など生体試料中のダイオキシン毒性等価量をモニターすることができる。また、他の同族体との交差率もTEFと良く関連するため、環境試料などの毒性評価にも使用できる。

D35-42：2,3,7,8-TCDDおよび1,2,3,7,8-PeCDDと特異的に反応するため、簡単な前処理を行うだけであらゆる試料中の前記2種ダイオキシン同族体を測定することができる。

【0022】II. 2,3,7,8-TCDDの標準曲線

第二抗体固定化プレートに0.1%ゼラチンを含むPBSで希

釈したマウス腹水 (D2-37：200,000倍、D9-36：1,000,000倍、D35-42：400,000倍) と I-5-HRP (0.4 μg/mL) の混液 90 μL 及び 2,3,7,8-TCDDの0.05%トリトンX-100溶液 (0.4, 2, 10, 50, 250, 1250 pg/10 μL) 10 μLを各ウエルに加えて4で一晚放置した。以下、前記と同様に操作して吸光度を測定した。図4に示した通り、本ELISAによる2,3,7,8-TCDDの測定限界は1 pg前後であり、公知の方法に比較して100倍前後の感度の向上がみられた。

【0023】公知のモノクローナル抗体との比較

前述の特開昭63-14691号公報 (USP4, 798, 807号) に記載されたダイオキシン類に対するモノクローナル抗体DD-1、DD-3、DD-4、DD-5、DD-6との、ダイオキシン類との交差率及びアイソタイプに関し比較したものを表3に示す。

【表3】

ハイブリドーマ	アイソタイプ*		交差率(2,3,7,8-TCDDを1とした場合)							
	クラス	L鎖	(1)	(2)	(3)	(7)	(8)	(10)	(17)	
DD-1	IgG1	κ	1.00	6.25	0.10	< 0.01	2.50	0.40	< 0.01	
DD-3	IgG1	κ	1.00	3.13	0.13	< 0.01	3.57	8.33	< 0.01	
引例 DD-4	IgG2a	κ	1.00	20.71	0.03	< 0.01	0.45	5.80	< 0.01	
DD-5	IgG2a	κ	1.00	3.00	< 0.09	< 0.05	10.00	6.00	< 0.05	
DD-6	IgG2a	κ	1.00	1.43	< 0.05	< 0.03	20.00	1.67	< 0.03	
D2-37	IgG2a	κ	1.00	0.19	0.10	0.03	0.26	0.29	0.02	
本発明 D9-36	IgG1	κ	1.00	0.48	0.06	0.002	0.23	0.45	0.008	
D35-42	IgG2a	κ	1.00	0.96	< 0.005	0.000	< 0.005	< 0.005	0.0001	

- (1) : 2,3,7,8-TCDD
 (2) : 2,3,4,7,8-PeCDD
 (3) : 1,2,3,4,7,8-HxCDD
 (7) : 1,2,3,4,5,6,7,8-OCDD
 (8) : 2,3,7,8-TCDF
 (10) : 2,3,4,7,8-PeCDF
 (17) : 1,2,3,4,5,6,7,8-OCDF

表3から判るように、

(i) 本発明の抗体は、公知の引例のものに比較して(2)(8)(10)との交差率が異なり、新規なモノクローナル抗体である。

(ii) 本発明の抗体は、公知の引例のものと同族化合物との交差率が異なるので、毒性評価において、測定値と毒性当量との相関性が異なる。

(iii) 本発明の3種のモノクローナル抗体は、ダイオキシン類の中で最も毒性の強い(1)2,3,7,8-TCDDに最大の親和性を有し、また同様に毒性の強い(2)1,2,3,7,8-PeCDD、(10)2,3,4,7,8-PeCDFおよび/または(8)2,3,7,8-TCDFに親和性が高い。母乳など生体試料中のダイオキシン同族体含有比は個体差が小さく、前記3種(1)、(2)、(10)の同族体で全TEQ(毒性当量)の大部分を占めているため、本モノクローナル抗体を用いるELISAにより生体試料中のTEQをモニタリングすることが可能である。特に、D9-36のダイオキシン同族体との交差率はTEF(toxic equivalency factor)と近似しているため、同族体含有比の異なる試料についても適用できる可能性が有る。また、D35-42はTCDD及びPeCDDのみを認識するため、各同族体含有の大きく異なる環境試料でも前記2種の同族体を測定できる可能性がある。先にも述べたが、本発明の3つのモノクローナル抗体は以下のような特徴を有する。

D2-37: 2,3,7,8-TCDDに親和性が最も高く、他の同族体との交差率が低いため、ダイオキシン類の中で最も毒性の強い2,3,7,8-TCDDを特異的かつ高感度で測定することができる。

D9-36: 2,3,7,8-TCDDの他、1,2,3,7,8-PeCDDおよび2,3,4,7,8-PeCDFにも親和性が高いため、母乳など生体試料中のダイオキシン毒性等価量をモニターすることがで

*きる。また、他の同族体との交差率もTEFと良く相関するため、環境試料などの毒性評価にも使用できる。

D35-42: 2,3,7,8-TCDDおよび1,2,3,7,8-PeCDDと特異的に反応するため、簡単な前処理を行うだけであらゆる試料中の前記2種ダイオキシン同族体を測定することができる。

【0024】

【発明の効果】本発明のモノクローナル抗体類は、試料中に含有されているダイオキシン類の同定のために用いることができ、試料中のダイオキシン類の濃度測定に用いることができる。対象試料としては、土壌、水、飛灰、大気及び動植物の組織、ヒト血液や母乳等の生体試料等を挙げることができる。本発明のモノクローナル抗体はダイオキシン類中、とりわけ毒性の強い、2,3,7,8-TCDDと1,2,3,7,8-PeCDDをターゲットの両同族体にはほぼ等しい親和性を示す、いわゆる群特異的なモノクローナル抗体であり、ダイオキシン汚染の高感度な一次簡易スクリーニング法及び毒性のモニタリング法として有用である。本発明のモノクローナル抗体は一定品質のものを大量かつ半永久的に供給することが可能なため、イムノアッセイの確立ばかりか、分析試料の簡易クリーンアップ法としてのイムノアフィニティー抽出法の開発にも極めて有用である。又本発明では上記モノクローナル抗体を用いてELISA法を確立し、標準溶液の測定域は1~1000pgであることから、極微量のダイオキシンを定量することが出来、母乳中のダイオキシンのTEQ換算曝露レベル評価に十分、実用性が高いものである。

【0025】

【図面の簡単な説明】

【図1】ハイブリドーマD2-37から得られたモノクローナル抗体の毒性等価係数と交差率を示すグラフである。

【図2】ハイブリドーマD9-36から得られたモノク

ローナル抗体の毒性等価係数と交差率を示すグラフである。

【図3】ハイブリドーマD35-42から得られたモノクローナル抗体の毒性等価係数と交差率を示すグラフで

ある。

【図4】本発明のモノクローナル抗体を用いたELISA法によるダイオキシン(2,3,7,8,-TCDD)の測定感度と範囲を示すグラフである。

【図1】

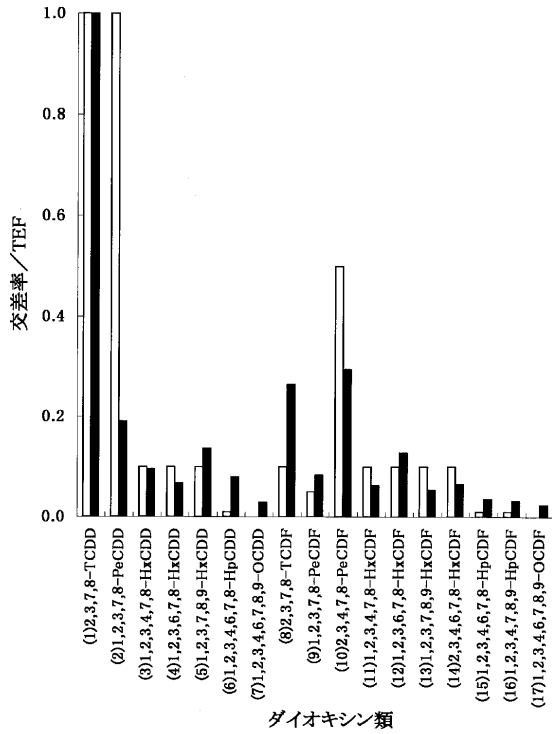


図1 D2-37の交差率(■)とTEF(□)

【図2】

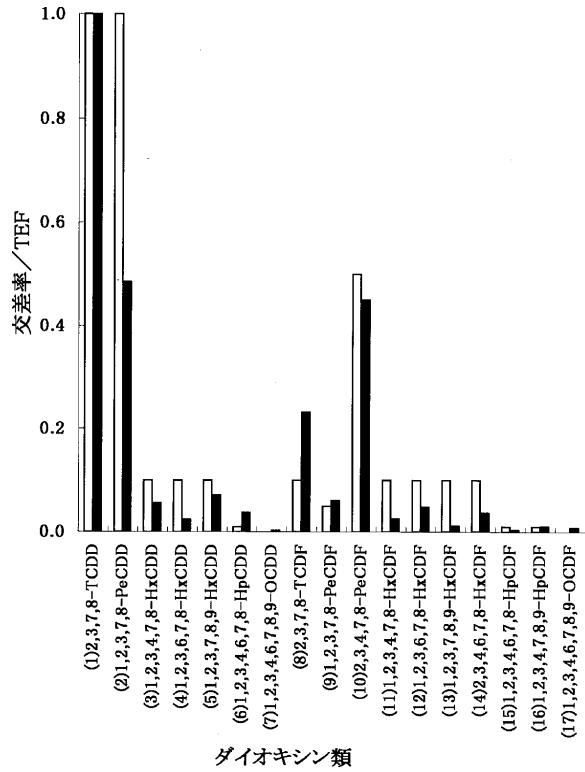


図2 D9-36の交差率(■)とTEF(□)

【図3】

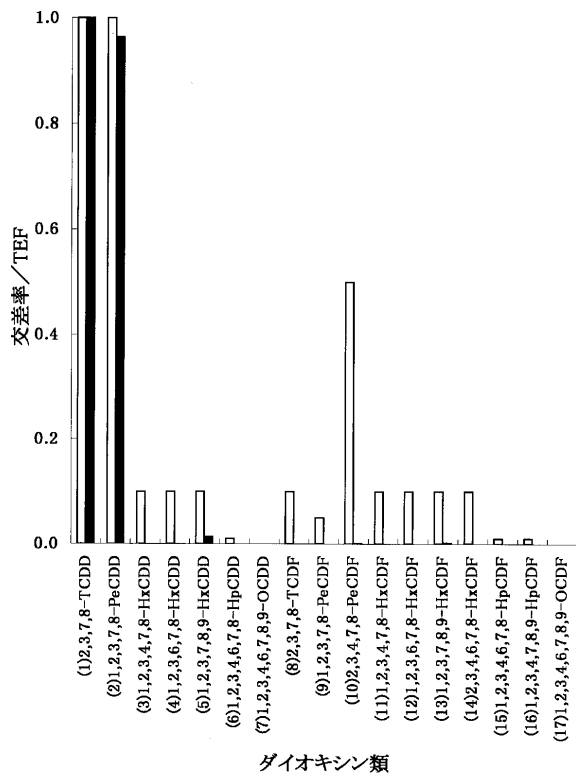
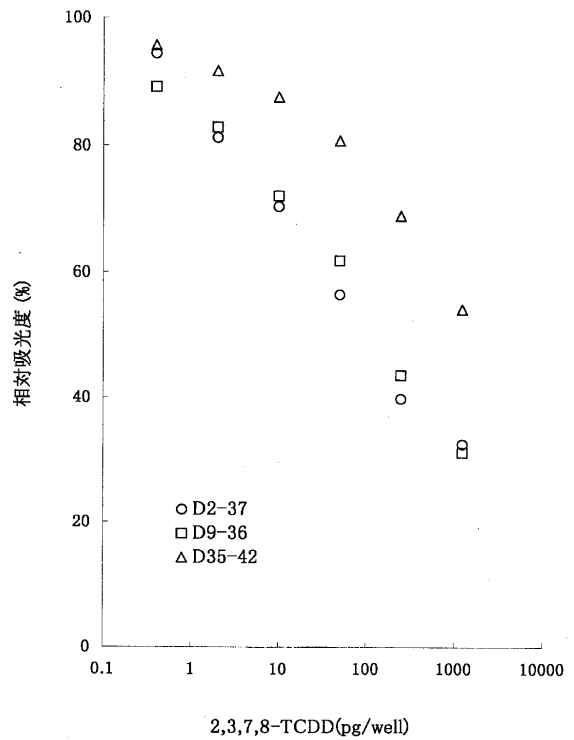


図3 D35-42の交差率(■)とTEF(□)

【図4】



(図4) 2,3,7,8-TCDD の標準曲線

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード ⁸ (参考)
C 1 2 N 9/38		G 0 1 N 33/53	G
C 1 2 P 21/08		33/543	5 4 5 A
G 0 1 N 33/53		33/577	B
	33/543		
	33/577		
//(C 1 2 N 5/10		C 1 2 R 1:91)	
C 1 2 R 1:91)		(C 1 2 P 21/08	
(C 1 2 P 21/08		C 1 2 R 1:91)	
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 N 15/00	C
		5/00	B
		C 1 2 R 1:91)	

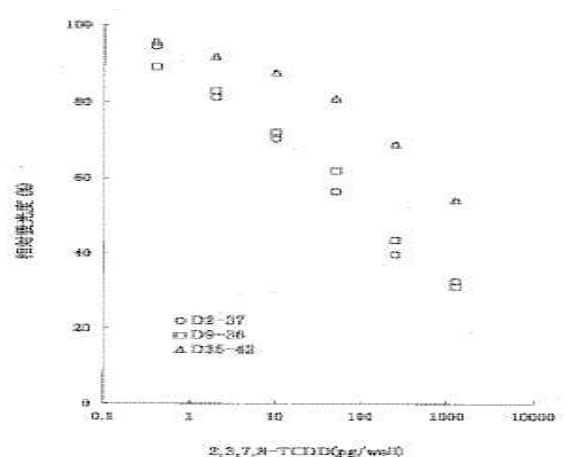
- (72) 発明者 佐藤雅之
静岡県静岡市谷田52 - 1 静岡県立大学・薬学部内
- (72) 発明者 後藤順一
宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 東北大学大学院・薬学研究科内
- (72) 発明者 奥山 光伸
神奈川県秦野市落合729 - 5 財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所内

- Fターム(参考) 4B024 AA11 AA17 BA08 BA11 BA53
DA02 FA10 GA05 HA15
4B050 CC02 DD02 DD09 LL03
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
DA16
4B065 AA92X AB05 AC10 CA25
CA46 CA54
4H045 AA11 AA20 AA30 BA30 BA51
CA42 DA75 EA50 FA72

专利名称(译)	抗二恶英的单克隆抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2002119279A	公开(公告)日	2002-04-23
申请号	JP2000315948	申请日	2000-10-16
[标]申请(专利权)人(译)	基金会食品药品安全中心		
申请(专利权)人(译)	基金会食品药品安全中心		
[标]发明人	松木容彦 神戸川明 佐藤雅之 後藤順一 奥山光伸		
发明人	松木 容彦 神戸川 明 佐藤雅之 後藤順一 奥山 光伸		
IPC分类号	G01N33/53 C07D319/24 C07K16/44 C12N5/10 C12N9/08 C12N9/38 C12N15/02 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/543 G01N33/577		
FI分类号	C07D319/24 C07K16/44 C12N9/08 C12N9/38 C12P21/08 G01N33/53.G G01N33/543.545.A G01N33/577.B C12R1/91 C12N15/00.C C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA17 4B024/BA08 4B024/BA11 4B024/BA53 4B024/DA02 4B024/FA10 4B024/GA05 4B024/HA15 4B050/CC02 4B050/DD02 4B050/DD09 4B050/LL03 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B064/DA16 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC10 4B065/CA25 4B065/CA46 4B065/CA54 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA30 4H045/BA51 4H045/CA42 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA72		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：建立一种简单，高灵敏度的酶免疫测定方法，用于人体生物样品中的二恶英。解决方案：检测人体生物样品中的二恶英，并通过酶免疫测定法检测单克隆抗体，该抗体对一种或多种二恶英具有特异性，对二恶英中的2,3,7,8-四氯二苯并对二恶英具有最大的亲和力。



(圖4) 2,3,7,8-TCDD の標準曲線