(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2007-187650
(P2007-187650A)
(43)公開日　平成19年7月26日(2007.7.26)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	S	2G054
G01N 33/543	(2006.01)	G01N	33/543	511H	
G01N 21/78	(2006.01)	G01N	21/78	Z	

審査請求 未請求　請求項の数 14　ＯＬ　（全 21 頁）

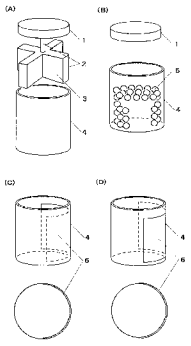
(21)出願番号　特願2006-309332 (P2006-309332)
(22)出願日　平成18年11月15日 (2006.11.15)
(31)優先権主張番号　特願2005-363166 (P2005-363166)
(32)優先日　平成17年12月16日 (2005.12.16)
(33)優先権主張国　日本国 (JP)

(71)出願人　000155023
株式会社堀場製作所
京都府京都市南区吉祥院宮の東町２番地
(71)出願人　000232564
バイエルクロップサイエンス株式会社
東京都千代田区丸の内１丁目６番５号
(74)代理人　100104422
弁理士　梶崎　弘一
(74)代理人　100105717
弁理士　尾崎　雄三
(74)代理人　100104101
弁理士　谷口　俊彦
(74)代理人　100113147
弁理士　今木　隆雄

最終頁に続く

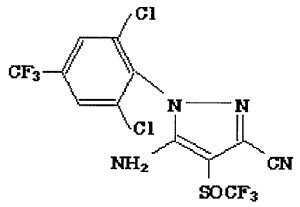
(54)【発明の名称】免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キット

(57)【要約】
【課題】　フィプロニルの施用現場での測定において、免疫測定法を利用した操作性に優れたフィプロニルの測定法及びそのキットを提供すること。
【解決手段】　免疫測定法によるフィプロニルの測定キットであって、（１）採取した測定対象物から溶剤を用いてフィプロニルを抽出する為の抽出ユニット、（２）識別抗原を封入する反応容器、抗フィプロニル抗体を固相化する固定部材、および前記反応容器に嵌装可能な封止部材からなり、かつ前記試料または試料希釈液を接触させることにより抗原抗体反応を行うことを特徴とする反応ユニット、および任意に（３）前記反応の結果、測定対象物中のフィプロニル濃度に依存した変化を目視あるいは光学的に検出する検出ユニット、および（４）該試料液を所定比率に希釈する希釈ユニット、を有する測定キットを提供する。
【選択図】　図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
免疫測定法によるフィプロニルの測定キットであって、
１）測定対象物から溶剤を用いてフィプロニルを抽出する為の抽出ユニット、および
２）識別抗原を封入する反応容器、抗フィプロニル抗体を固相化する固定部材、および前記反応容器に嵌装可能な封止部材を含む、反応ユニット
を有することを特徴とする免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キット。
【請求項２】
前記識別抗原が、フィプロニルのハプテンと識別機能を有する物質との結合体であり、前記抗体がモノクローナル抗体またはそのフラグメントである請求項１記載の免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キット。
【請求項３】
前記反応容器として、識別抗原を封入した少なくとも１つの反応容器と、識別抗原および既知量のフィプロニルを封入した少なくとも１つの反応容器との組合せを用いることを特徴とする請求項１または２記載の免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キット。
【請求項４】
前記識別抗原および識別抗原と既知量のフィプロニル混合物を各々予め乾燥した状態にて前記反応容器に封入するとともに、識別抗原のみの反応容器内においては前記試料液によって溶解し、前記混合物を封入した反応容器においては溶解液によって溶解することを特徴とする請求項１～３のいずれかに記載の免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キット。
【請求項５】
前記反応ユニットが、試料中のフィプロニル濃度に依存した変化を目視あるいは光学的に検出する為の検出機能を兼ねていることを特徴とする請求項1～４までのいずれかに記載の免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キット。
【請求項６】
さらに、前記試料中のフィプロニル濃度に依存した変化を目視あるいは光学的に検出する為の検出ユニットを含むことを特徴とする請求項1～５までのいずれかに記載の免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キット。
【請求項７】
さらに、前記抽出ユニットにて抽出した試料液を所定比率に希釈する希釈ユニットを含むことを特徴とする請求項1～６までのいずれかに記載の免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キット。
【請求項８】
前記抽出ユニットが、測定対象物からフィプロニルを抽出する為の溶剤を含むことを特徴とする請求項１～７までのいずれかに記載の免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キット。
【請求項９】
前記抽出ユニットにおける溶剤が、エタノール、メタノールおよびジメチルスルホキシドからなる群より選択される１種または２種以上の組合せであることを特徴とする請求項８記載の免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キット。
【請求項１０】
前記測定対象物が、カプセル製剤含有物であることを特徴とする請求項１～９までのいずれかに記載の免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キット。
【請求項１１】
前記カプセル製剤が、マイクロカプセルの形態であることを特徴とする請求項１０に記載の免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キット。
【請求項１２】
免疫測定法によるフィプロニルの測定方法であって、
１）採取した測定対象物から溶剤を用いて、フィプロニルを抽出する工程、

２）前記抽出する工程により得られたフィプロニル含有試料液を、識別抗原を封入した反応容器にて、抗フィプロニル抗体が固相化された固定部材に接触させる工程、および
３）前記接触させる工程により抗原抗体反応することによる、該試料液中のフィプロニル濃度に依存した変化量を検出する工程、
を含むことを特徴とする、免疫測定方法によるフィプロニルの測定方法。
【請求項１３】
前記識別抗原が、フィプロニルのハプテンと識別機能を有する物質との結合体であり、前記抗体がモノクローナル抗体またはそのフラグメントであることを特徴とする請求項１２記載の免疫測定方法によるフィプロニルの測定方法。
【請求項１４】
前記検出する工程が、前記抽出により得られた試料液における変化量と、一定量のフィプロニルを含有する試料液における変化量とを比較する工程であることを特徴とする請求項１２または１３記載の免疫測定方法によるフィプロニルの測定方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、免疫測定法を用いたシロアリ駆除剤フィプロニルの測定キットに関する。土壌中に残存するフィプロニル濃度の簡易な測定キットとして、特にフィプロニルの施用現場で測定するのに有用である。
【背景技術】
【０００２】
フィプロニル（化学名：５－アミノ－１－（２，６－ジクロロ－４－（トリフルオロメチル）フェニル）－４－（（トリフルオロメチル）スルフィニル）－１Ｈ－ピラゾール－３－カルボニトリル）は、以下の式（１）：
【化１】



（１）

で表される構造を有するフェニルピラゾール系化合物である。本化合物は、シロアリ駆除剤として使用されるほかに、殺虫剤として、ウンカ・ヨコバイ類，アブラムシ類，コナジラミ類，カメムシ類，コナカイガラムシ類，ツノロウムシ類等の半翅目害虫，シンクイムシ類，チャノホソガ，キンモンホソガ，ギンモンハモグリガ，モモハモグリガ，ミカンハモグリガ等の鱗翅目害虫，更には鞘翅目害虫や直翅目害虫などの幅広い農業害虫に優れた薬効を示し、浸透移行や残効性を有する。
【０００３】
特に、シロアリ駆除剤としては、対象の建築物などの基盤部分や床下の土壌などで長期にわたり残効性を有さねばならず、定期的なフィプロニル濃度のモニタリングが重要である。ここで、シロアリ駆除剤としてのフィプロニルは、乳液等に有効成分として含まれる場合の他、カプセル製剤に含まれている場合もある。カプセル製剤としては、限定はされないが、マイクロカプセルが包含される。
【０００４】
従来、フィプロニルの残留濃度は、対象物である土壌等からフィプロニルを抽出し、精製した後、ガスクロマトグラフィー（ＧＣ）により分析されてきた。即ち、試料をアセトンで抽出し、多孔性ケイソウ土カラム、フロリジルカラム、シリカゲルカラム、C_{18}カラム、フロリジルカラムの順で精製後、ＧＣで測定されている。本測定法は、精度や感度

においては申し分ないが、高価な設備と高度な技術を必要とするため、屋外での測定には不向きだった。

【０００５】

一方、免疫測定法は、抗体の抗原に対する特異的な反応性を利用して抗原の測定を行うもので、測定精度が優れているばかりでなく、前記ＧＣのような複雑な精製工程や高価な設備を必要としないことから、迅速、簡便かつ経済的な測定法である。従来、免疫測定法は、臨床診断の分野で患者の病態解析法の一つとして大きな役割を担ってきたが、近年環境負荷化学物質測定への適用が進んでいる。フィプロニルにおいても、フィプロニル誘導体を結合したタンパク質を免疫して作製したモノクローナル抗体を用いて、フィプロニルの免疫測定法が開発されている。

【特許文献１】特願２００５－１４７６９３

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

従来、フィプロニル測定に使用されてきた上記ＧＣによる分析方法は、試料の抽出・精製工程に煩雑な手順と時間を必要とする。また、高額の費用を投資して測定装置や設備を設置したいわゆる分析施設で測定する必要があった。したがって、ＧＣは、シロアリ駆除剤フィプロニルを施用した現場で、残効性確認のために適用することが出来なかった。

【０００７】

一方、免疫測定法は、複雑な精製工程を必要としないことから、現場での測定に比較的適した測定方法である。しかしながら、通常用いられるマイクロプレートを利用した免疫測定法は、やはり分析施設内で好適に用いられるもので、シロアリ駆除剤施用現場である住宅地などにおいて好適な使用方法を提供しているとはいえなかった。

【０００８】

さらに、フィプロニルがマイクロカプセル等のカプセル製剤として存在する場合には、カプセル部分を溶かさなければ測定が可能とならず、施用現場においてより簡便な測定方法が必要であった。

【０００９】

本発明の目的は、フィプロニルの施用現場での測定において、免疫測定法を利用した操作性に優れたフィプロニルの測定法及びそのキットを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、以下に示す免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キットにより上記目的を達成できることを見出し、本発明を完成するに到った。

【００１１】

すなわち、本発明は、免疫測定法によるフィプロニルの測定キットであって、

１）測定対象物から溶剤を用いてフィプロニルを抽出する為の抽出ユニット、２）識別抗原を封入する反応容器、抗フィプロニル抗体を固相化する固定部材、および前記反応容器に嵌装可能な封止部材を含む、反応ユニットを有する、免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キットを提供するものである。

【００１２】

ここで、本発明の免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キットでは、上記識別抗原は、フィプロニルのハプテンと識別機能を有する物質との結合体であり、上記抗体は、モノクローナル抗体またはそのフラグメントであり得る。

【００１３】

本発明の免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キットではまた、上記反応容器として、識別抗原を封入した少なくとも１つの反応容器と、識別抗原および既知量のフィプロニルを封入した少なくとも１つの反応容器との組合せを用いることができる。

【００１４】

本発明の免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キットでは、上記識別抗原および識別

抗原と既知量のフィプロニル混合物を各々予め乾燥した状態にて上記反応容器に封入するとともに、識別抗原のみの反応容器内においては上記試料液によって溶解し、上記混合物を封入した反応容器においては溶解液によって溶解することができる。

【００１５】

本発明の免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キットでは、上記反応ユニットは、試料中のフィプロニル濃度に依存した変化を目視あるいは光学的に検出する為の検出機能を兼ねることもできる。

【００１６】

本発明の免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キットでは、上記試料中のフィプロニル濃度に依存した変化を目視あるいは光学的に検出する為の検出ユニットを含ませることもできる。

【００１７】

本発明の免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キットでは、上記抽出ユニットにて抽出した試料液を所定比率に希釈する希釈ユニットを含ませることもできる。

【００１８】

本発明の免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キットでは、上記抽出ユニットにおいて、溶剤を含ませることができる。この溶剤は、エタノール、メタノールおよびジメチルスルホキシドからなる群より選択される１種または２種以上の組合せであり得る。

【００１９】

本発明においては、上記測定対象物は、カプセル製剤含有物であり得る。さらに、このカプセル製剤は、マイクロカプセルの形態であり得る。

【００２０】

本発明の免疫測定法による免疫測定方法によるフィプロニルの測定方法は、１）採取した測定対象物から溶剤を用いて、フィプロニルを抽出する工程、２）上記抽出する工程により得られたフィプロニル含有試料液を、識別抗原を封入した反応容器にて、抗フィプロニル抗体が固相化された固定部材に接触させる工程、および３）上記接触により抗原抗体反応することによる、試料中のフィプロニル濃度に依存した変化量を検出する工程、を含む。

【００２１】

本発明の免疫測定方法によるフィプロニルの測定方法においては、上記識別抗原は、フィプロニルのハプテンと識別機能を有する物質との結合体であり、上記抗体は、モノクローナル抗体またはそのフラグメントであり得る。

【００２２】

上記検出する工程は、上記抽出により得られた試料液における変化量と、一定量のフィプロニルを含有する試料液における変化量とを比較する工程であり得る。

【発明の効果】

【００２３】

以上のように、本発明を適用することによって、土壌中に施用した種々の形態のフィプロニルに対して選択性が高く、施用現場においても操作性に優れた簡易な免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キットまたは免疫測定方法を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２４】

以下、本発明の実施の形態について説明する。

【００２５】

抗原抗体反応を利用した免疫測定法は、一般に特定の物質に対して高い選択性を有し、高感度測定が可能であり、かつ操作が容易な測定法である。本発明はこうした特長を活かしながら、フィプロニルの測定においてキットの形状や反応に関与する抗体の固相化手段、反応物質同士の接触手段や操作手段および反応状態の検出手段を選定し、現場でも最適な操作が可能な簡便性を有する測定キットの構成または測定方法を可能にしたものである。

【００２６】
つまり、予め反応に寄与する識別抗原を安定な条件で封入した反応容器を準備し、その反応容器において全ての操作ができるようにすることによって、操作性・安定性に優れた簡便な測定キットを構成することおよび測定方法を行うことが可能となった。具体的には、測定対象物からフィプロニルを抽出後、調製したサンプルを、識別抗原を封入した反応容器に投入することを第１ステップとすることによって、サンプル中のフィプロニルと識別抗原との均一な混合を図ることができる。次に、抗フィプロニル抗体を固相化した担体を反応容器に挿入あるいは導入することを第２ステップとすることによって、フィプロニルと識別抗原との間における競合的な抗原抗体反応を迅速かつ確実に行うことができる。さらに、第３ステップとして、例えば、こうした反応によって得られた反応物を、抗体と結合した識別抗原に由来する発色反応として検出するように、試料中のフィプロニル濃度に依存した変化を目視あるいは光学的に検出することによって、フィプロニルの濃度を求めることができる。これらの競合反応や発色反応は、屋外でも操作しやすいように密栓して行うことができる。以上のように、予め識別抗原を封止した反応容器中で、攪拌、反応、測定など、全ての操作を行う特徴を有している。

【００２７】
なお、ここでいう「目視あるいは光学的に検出する」とは、抗原－抗体反応に伴う変化を、反応自体によって生じる発色や蛍光あるいは発色剤や蛍光剤を添加することによって生じる発色や蛍光、または濁度などの、光学的変化として取り出し、目視あるいは吸光光度計などによって検出することをいう。

【００２８】
免疫測定法において、識別抗原が測定対象となるフィプロニルと競合反応を形成するには、フィプロニルに近い分子構造を有しかつ抗体のエピトープを有する物質を識別抗原とすることが好ましい。本発明においては、識別抗原をフィプロニルの誘導体と識別機能を有する物質の結合体とすることによって、この条件を満たすことができ選択性の高い測定が可能となる。また、抗体については、一般にポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体があるが、モノクローナル抗体が有する高感度および高選択性から、特にモノクローナル抗体が好ましい。本発明においては、これらを組み合わせることによって、非常に選択性が高く高感度な免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キットを提供することが可能になった。ここで、「識別機能を有する物質」とは、抗原-抗体反応の結果を直接的あるいは間接的に識別可能にする物質あるいは担体物質をいい、具体的には酵素や蛍光タンパク質のような生体物質、低分子の蛍光物質、金コロイド、カラーラテックスビーズなどの担体が挙げられる。また、本発明に係る抗原－抗体反応においては、さらに、こうした抗体のみならず、ＦａｂフラグメントやＦ（ａｂ’）２フラグメントなどのように抗原結合性を有する抗体の一部も包含される。

【００２９】
本発明に係る測定キットまたは方法においては、抗原抗体反応後の結果を色量変化などの目視的あるいは光学的変化として検出することから、試料液中のフィプロニルの濃度に対する基準を明確にすることが好ましい。そこで、ゼロを含む既知濃度のフィプロニルを封入した複数の反応容器を準備し、試料液を投入した反応容器との色量変化を比較することによって、バックグランドや周囲温度などの影響を排除した測定を行うことが可能となる。つまり、測定条件を共通にした基準との比較を行うことによって、簡易かつ精度の高い免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キットまたは方法を提供することが可能となる。

【００３０】
一般に識別抗原として用いる薬剤の中には、自然放置すると長期的安定性に欠ける場合がある。こうした変質が生じた場合には、活性度の低下に伴い反応速度だけでなく反応そのものに影響することから測定精度に大きな影響を与えることがある。本発明は、識別抗原を凍結乾燥することによって、薬剤の変質を防止し使用直前に最適な反応状態を確保することができることを見出したもので、反応容器内において、試料液または希釈した試料

液（以下「試料液」という。）または溶解液によって、識別抗原を溶解させると同時に、抗原－抗体反応を開始し、迅速な免疫測定法を用いたフィプロニルの測定を行うことが可能となる。また、反応容器内において反応を開始させ完結させることができることから、現場での作業性の優れた測定キットを構成することができる。なお、ここでいう「溶解液」とは、例えば希釈液などのように反応に関与せず、予め凍結乾燥した識別抗原や識別抗原と既知量のフィプロニル混合物を溶解するために用いる溶媒をいう。

【００３１】

本発明においては、抗原抗体反応後の結果を色量変化などの目視的あるいは光学的変化検出は、反応ユニットにおいても行いうるし、別の検出ユニットを設けて行うこともできる。さらに本発明では、抽出ユニットにて調製したフィプロニル含有試料液を所定比率に希釈する希釈ユニットを含んでいてもよく、この希釈ユニットにより、測定対象物から抽出した試料液を適宜反応に適する濃度に希釈し得る。

【００３２】

本発明では、抽出ユニットに含まれる溶剤は、エタノールおよびジメチルスルホキシドからなる群より選択される1種または2種以上の組合せであり得る。１つの態様において、前記測定対象物は、カプセル製剤を含有し、このカプセル製剤は、マイクロカプセルの形態であり得る。

【００３３】

本発明では、マイクロカプセルにフィプロニルのようなシロアリ駆除剤を封入して用いているような場合をも想定する。すなわち、シロアリ駆除剤の人体への影響は、カプセル化により最小限に抑えられると同時に、シロアリに対しては、グルーミングなどによって口の中に入ったマイクロカプセルを噛み砕いて体内に取り込み、マイクロカプセルの中の有効成分が効果を発揮する。この為、近年広くマイクロカプセルを始めとするカプセル化の技術が使われている。従って、フィプロニルのカプセル製剤中の量を正確に測定する為の対応が必要であり、試料中のカプセル部分を溶かすと共にフィプロニルを抽出するような溶剤の選択が重要となる。

【００３４】

＜本発明にかかる測定キットの基本構成および測定方法＞

本発明にかかる免疫測定法を用いたフィプロニルの測定キットは、（１）採取した測定対象物から溶剤を用いて抽出したフィプロニル含有試料液を調製する為の抽出ユニット、（２）識別抗原を封入する反応容器、抗フィプロニル抗体を固相化する固定部材、および前記反応容器に嵌装可能な封止部材からなり、かつ前記試料液を接触させることにより抗原抗体反応を行うことを特徴とする反応ユニット、を含む。

【００３５】

つまり、これらの手段を組み合わせることによって、免疫測定法の特徴を活かしながら、反応容器の形状、反応に関与する試剤の製剤化方法、反応物質同士の接触方法および反応状態の検出方法を選定し、フィプロニルの施用現場でも好適に使用可能な測定キットを構成することを可能にした。

【００３６】

上記測定キットの測定方法は、通常の免疫測定法の中でも、公知の例えば酵素免疫測定法、金コロイド法等(Meth. Enzymol., 92, 147-523 (1983), Antibodies Vol.II IRL Press Oxford (1989))を適用することができる。

【００３７】

以下、酵素免疫測定法の中でも抗体固相タイプのＥＬＩＳＡ（Ｅｎｚｙｍｅ－Ｌｉｎｋｅｄ Ｉｍｍｕｎｏｓｏｒｂｅｎｔ Ａｓｓａｙ）を適用した場合を例に、測定キットの基本構成となる各ユニットを説明するが、本発明はこれに限定されない。また、説明するそれぞれの材料等は、ＥＬＩＳＡを適用した測定キットに限らず、他の標識を使用した場合の測定キット、あるいはＥＬＩＳＡまたは他の標識を使用した場合の測定方法にも共通して使用可能なものである。ここで、測定対象物としては、土壌や環境水などを挙げることができ、測定物質としては、防虫剤あるいは駆除剤などの薬剤であるフィプロニルが対

象となる。

【００３８】

（１）抽出ユニット

例えば、土壌を溶剤の入ったポリプロピレン、ポリエチレンなどの樹脂製またはガラス製の容器に加え、攪拌することによってフィプロニルを抽出する。抽出するための溶剤としては、メタノール、アセトン、アセトニトリル、酢酸エチル、エタノール、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドが挙げられる。このような溶剤は予め容器に入れておくか、キットに別途含まれていてもよい。またはキットには容器のみが含まれていて、溶剤は別途調達することも可能である。好適な溶剤の濃度は、３０～１００％程度である。すなわち、これらの溶剤は水溶液の形態でもよい。溶剤は、フィプロニルがマイクロカプセル等のカプセル製剤の形態中に存在するものであっても、カプセル部分を溶解することができるものが好ましいが、これに限定されない。すなわち、フィプロニルの製剤形態のいかんに関わらず用いることができる溶剤が好ましい。メタノールは、フィプロニルに対して溶解性が高く、高い抽出効率を得ることができる点において優れている。また、疎水性が低く、たんぱく質などに対する変質作用が少ない点においても優れている。さらには、メタノール４０～５０％が、高い抽出効率を得られ、危険性が少ないことから、より好ましい。一方、フィプロニルが土壌中にマイクロカプセルなどのカプセル製剤として存在する場合、上記いずれの溶剤も用いることはできるが、カプセル成分を完全に溶解する必要があり、その場合には、エタノールまたはジメチルスルホキシドが好ましい。特にエタノールは、相対的に毒性が低く、市販の無水エタノールを使用できることから、より簡便な測定が可能となるため好ましい。

【００３９】

（２）抗原抗体反応ユニット

（ａ）識別抗原を封入した免疫反応容器の作製

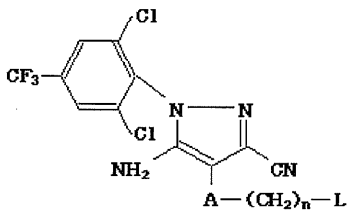
（ａ－１）識別抗原の調製

フィプロニルと競合的な抗原抗体反応を行う識別抗原としては、フィプロニルと競合的な抗原抗体反応を生じるフィプロニルもしくはその誘導体に、酵素を結合したものを用いる為、誘導体としては、酵素との結合基を有するものを用いるとよい。使用可能な酵素としては、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、βガラクトシダーゼ等が挙げられるが、公知のものであれば特に制限はない。誘導体と酵素の結合は、酵素が失活しない条件なら特に制限なくいかなる方法で行ってもよい。以下、フィプロニルの誘導体の構造について具体的に説明する。

【００４０】

上記式（化１）のようなフィプロニルの誘導体としては、下記式（化２）で表わされる構造を有する化合物を挙げることができる。

【化２】



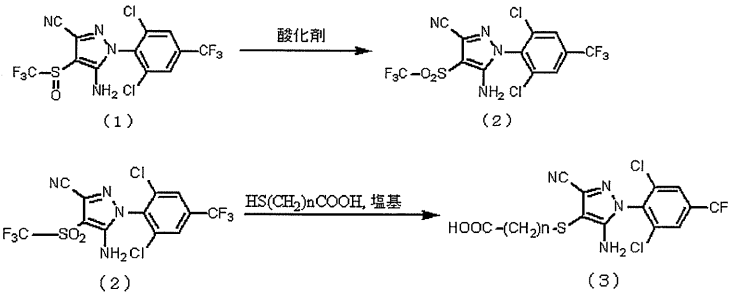
（２）

式（２）中、Ａは－Ｓ（Ｏ）ｍ－、酸素原子、－ＣＨ$_2$－および－ＮＨ－からなる群より選択される1種を、Ｌはカルボキシル基、アミノ基、アルデヒド基およびヒドロキシル基からなる群より選択される1種を、ｍは０～２の整数を、ｎは１～１０の整数を表す。

【００４１】

上記式（２）で表される化合物において、Ｌが対象高分子と共有結合することにより、複合体を形成する。

【００４２】
ハプテン化合物として用いる上記式（２）で表される化合物の製造は、公知の合成方法により行うことができ、特に限定されるものではないが、例えば式（２）で表される化合物のＡが硫黄でＬがカルボキシル基のものについては、下記反応式：
【化３】



（式中ｎは前述と同じ意味を表す）で示す方法が、各工程において高収率で化合物を得ることから好適に用いられる。
【００４３】
具体的には、前記反応式において、
（１）工程１
出発原料として５－アミノ－４－トリフルオロメチルスルホニル－１－（２，６－ジクロロ－４－トリフルオロメチルフェニル）ピラゾール－３－カルボニトリル（１）を用い、酸化剤と反応させて５－アミノ－４－トリフルオロメチルスルホニル－１－（２，６－ジクロロ－４－トリフルオロメチルフェニル）ピラゾール－３－カルボニトリル（２）を得る。
【００４４】
この反応で酸化剤としては特に限定されないが、例えば過酸化水素、過酢酸、過安息香酸、メタクロロ過安息香酸などの過酸類、オゾン、過マンガン酸カリウム、クロム酸などを使用することができる。また触媒としてタングステンやパナジウムを用いることも出来る。溶媒としては、例えばメタノール、エタノールなどのアルコール類、ベンゼン、トルエンなどの芳香族炭化水素類、ジエチルエーテル、ジプロピルエーテル、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトン、メチルエチルケトンなどのケトン類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミドなどの酸アミド類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、酢酸などの酸、水およびそれらの混合溶媒などを挙げることができる。反応温度は通常室温から溶媒の沸点の温度で、３０分から１０時間程度行う。
【００４５】
（２）工程２
得られた化合物を塩基の存在下、3-メルカプトアルキルカルボン酸と反応させてω－［５－アミノ－３－シアノ－１－（２，６－ジクロロ－４－トリフルオロメチルフェニル）ピラゾール－４－イルチオ］アルキルカルボン酸（３）を得る。
本反応で用いられる塩基、溶媒については工程１と同様のものを用いることができる。反応温度は通常０℃から溶媒の沸点の温度で、反応時間は３０分から１０時間程度行う。
【００４６】
（ａ－２）免疫反応容器
免疫反応容器は、具体的には図１（Ａ）、（Ｂ）、（Ｃ）、および（Ｄ）に例示するような形態で、ポリプロピレン、ポリエチレンなどの樹脂製またはガラス製の容器を用いることが好ましい。また、本反応容器は、抗体を固相化した封止部材を嵌装することが可能な構造を有することが好ましいが、これに限定されない。

【００４７】
（ａ－３）識別抗原の免疫反応容器への封入
上記の反応容器は、予め識別抗原を封入した少なくとも１つの反応容器と、予め識別抗原および既知量のフィプロニルを封入した少なくとも１つの反応容器との組合せを用いることが好ましい。本発明においては、試料中のフィプロニルの濃度を発色反応後に色量変化として検出することから、例えば、バックグランド状態あるいは既知濃度のフィプロニルによる反応結果など色量変化に対する基準を明確にし、それらとの比較で濃度を判定することが好ましい。
【００４８】
具体的には、例えば予め識別抗原を封入した1つの反応容器にフィプロニルを含む試料液を投入し、もう１つあるいは２以上の予め識別抗原および既知量（２以上の場合は異なる既知量が好ましい）のフィプロニルからなる混合物を封入した反応容器との比較によって、基準となる既知量のフィプロニルとの関係から試料液中のフィプロニルの濃度を測定することができる。
【００４９】
反応容器に封入する識別抗原は、予め凍結乾燥した状態にして封入することが好ましい。上記のような識別抗原を構成する生体分子は、活性を維持することが難しく、特に水分共存下においては短時間で変性することが多い。本発明においては、識別抗原を予め凍結乾燥した状態で反応容器に封入しておくことによって、実際に使用するまでの変質を防止することが可能となる。具体的には、識別抗原の水溶液を反応容器に添加し、－２０℃～－１００℃程度の空間にて冷凍し、凍結状態を保ったまま真空中で乾燥することによって、凍結乾燥し、安定に封入することができる。
【００５０】
また、識別抗原のみ凍結乾燥するだけではなく、識別抗原および既知量のフィプロニルを混合し、凍結乾燥した状態で封入することも可能である。現場で試料液あるいは溶解液を加えてこれらを溶解することによって、溶解と同時に反応を開始することができる。
【００５１】
また、測定精度を上げるためには、上記の識別抗原および既知量のフィプロニルからなる標準混合物を封入した反応容器に加えて、予め識別抗原を封入した反応容器をバックグランド測定用としてフィプロニルを投入せずに比較対照とすることで、精度の高い試料液中のフィプロニルの濃度を測定することができる。
【００５２】
あるいは、試料中のフィプロニルの濃度が想定できる場合には、その前後の既知量のフィプロニルを封入した反応容器を準備し比較することによって、さらに精度の高い試料液中のフィプロニルの濃度を測定することができる。また、既知量のフィプロニルを封入した反応容器の数を増やし、複数の基準点との比較を行うことによって、試料中のフィプロニルの濃度が不明な場合であっても、高精度にフィプロニルの濃度を測定することができる。
【００５３】
さらに、上記のように、予め識別抗原のみを凍結乾燥した状態にて反応容器に封入するとともに、該反応容器内において、希釈試料液または既知量のフィプロニルを有する標準液によって溶解することも可能である。この方法においても、現場で液を投入し攪拌することによって、溶解と同時に反応を開始することができる。
【００５４】
（ｂ）抗体を固相化した固定部材の作製
（ｂ－１）抗体の調製
例えば式（２）で表されるフィプロニルのハプテン化合物を、牛血清アルブミン（ＢＳＡ）、ウサギ血清アルブミン（ＲＳＡ）、オボアルブミン（ＯＶＡ）、スカシ貝ヘモシアニン（ＫＬＨ）、チログロブリン（ＴＧ）、免疫グロブリン等の高分子化合物（タンパク質）との複合体を形成させた後、抗原として用いる。

【００５５】
複合体の形成方法は、公知の方法により行うことができ、特に限定されるものではない。例えば、混合酸無水物法または活性エステル法等によって、フィプロニルのハプテン化合物のカルボキシ基と前記高分子化合物の官能基とを反応させて、複合体を形成することができる。
【００５６】
本発明で用いられる抗体にはこのようにして得られた抗原で免疫したウサギやヤギなどの血液の中に含まれる抗体を分離・精製するいわゆるポリクローナル抗体や、抗体産生能を持つクローン化ハイブリドーマの分泌する抗体を分離・精製するいわゆるモノクローナル抗体がある。本発明においては、いずれの抗体を用いることも可能だが、モノクローナル抗体がフィプロニルに対して高選択性であることから、特にモノクローナル抗体が好ましい。モノクローナル抗体の調製方法は公知の方法であれば制限が無いが、ハイブリドーマをマウス腹腔に接種し生じた腹水中に分泌されたモノクローナル抗体を、プロテインＡカラムなどを用いて精製することができる。
【００５７】
（ｂ－２）固定部材
固定部材は、ポリエチレン・ポリスチレンなどのたんぱく質が吸着しやすい樹脂を棒状などに加工した部分を持つ部材を意味し、溶液との接触が容易で、かつ表面積の大きな抗体固相化部分を有することが好ましい。
【００５８】
また、抗体固相化部分を有する固定部材を封止部材と結合し、反応容器に挿入し、かつ嵌装可能な構造を有することが好ましい。具体的には、図１（Ａ）に例示するような蓋状部（封止部材）１とスティック形状部（固定部材）２を有し、スティック形状部２の先端部３に抗体を固相化した構成を挙げることができる。特に、先端部３を羽根状にすることによって大きな表面積の確保も可能である。こうして固相化された部材を免疫反応容器４と組み合わせることができる。このとき、反応容器４内部に識別抗原を封入し凍結乾燥などにより封止部材と非接触状態であれば、蓋状部１とスティック形状部２を一体化した状態で、反応容器内に挿入したままで封止することも可能である。
【００５９】
ここで、封止部材の蓋状部１とスティック形状部２は、分離可能な構成にしてもよい。使用前の状態では、免疫反応容器を蓋状部１によって封止し、抗原抗体反応時には、蓋状部１にスティック形状部２を着装して反応容器内に挿入し、蓋状部１によって封止する。この操作によって、免疫反応容器を攪拌し反応を促進することが可能となる。
【００６０】
また、封止部材は、図１（Ｂ）に例示するように、単に蓋状部１によって反応容器４を封止するための構成を挙げることができる。抗原抗体反応前は、例えば凍結乾燥した識別抗原を封止して識別抗原の安定性を確保し、反応時には、反応容器４の内部にラテックスビーズなどの担体５を抗体の固定部材として、封入し、封止することによって、攪拌し反応を促進することが可能となる。この場合は、抗体を封止部材には直接固相せず、封止部材から分離しているビーズ担体を抗体の固定部材として用いている。
【００６１】
（ｂ－３）抗体の固定部材への固相化
抗体の固相化は、例えば抗体を含む緩衝液を封止部材上に載せ、インキュベーションすればよい。緩衝液中の抗体の濃度は、通常０．０１μｇ／ｍＬから１０μｇ／ｍＬ程度である。緩衝液としては、特に制限無く公知のものを使用することができる。
以下、抗体が固相化された固定部材を「抗体固相化担体」という。
【００６２】
（ｂ－４）担体表面のブロッキング
試料中の夾雑物質が担体表面へ非特異的吸着し反応に影響することを防止するため、抗体が固相化されていない表面部分は抗体や識別抗原と反応性の無いタンパク質等によりブ

ロッキングすることが好ましい。ブロッキング剤としては、牛血清アルブミン（ＢＳＡ）もしくはスキムミルク溶液、または市販のブロックエース（大日本住友製薬社製）等を使用することができる。ブロッキングは、過剰濃度のブロッキング剤溶液へ抗体固相化担体を接触させ、例えば、約４℃で一晩インキュベーションした後、洗浄液で洗浄することにより行われる。洗浄液に制限はなく、例えば生理的塩濃度の塩化ナトリウムを含んだ緩衝液を使用することができる。

【００６３】

（ｂ－５）ブロッキンッグした固定部材の安定化

抗体を固相化し、ブロッキングした固定部材は、乾燥によって安定化できる。乾燥は低温下で行うほうがよく、真空凍結乾燥、減圧乾燥、風乾などいずれの乾燥方法でもよい。

【００６４】

（ｃ）抗原抗体反応

抽出ユニットにおいて調製した試料は、抗原抗体反応ユニットへ供する。具体的には、識別抗原を封入した免疫反応容器中へ試料を加え、抗体を固相化した固定部材を挿入することによって抗原抗体反応を開始する。この際、挿入した固定部材と結合した封止部材により反応容器を密栓することができる。また、他に既知濃度のフィプロニルと識別抗原を封入した免疫反応容器、あるいは識別抗原のみを封入した免疫反応容器へフィプロニルを含まない溶解液を添加することによって、より正確に試料中のフィプロニル濃度を調べることができる。抗原抗体反応は、反応温度４℃～３７℃、また反応時間５分～２時間程度で反応させるのがよい。

【００６５】

（３）検出

【００６６】

次に、反応の結果、測定対象物中のフィプロニル濃度に依存した変化を目視あるいは光学的に検出するが、これは、反応ユニットにおいて行ってもよいし、別途任意に含まれる検出ユニットにおいて行っても良い。

【００６７】

例えば、反応終了後は、水道水、精製水、緩衝液などで反応容器、固定部材および封止部材を洗浄後、固相化抗体と結合した識別抗原の酵素によって発色する基質溶液を反応容器に加える。発色基質としては、公知の基質であれば特に制限はなく、酵素、例えば、ペルオキシダーゼの場合は、３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジンを用いるとよい。基質溶液を加えた後に生じる発色量の変化を検出することによって、フィプロニルの濃度を判定する。

【００６８】

判定は、既知濃度のフィプロニルによる発色の程度を目視で比較することによって、簡易に行うことができる。より正確に測定するためには、発色の程度を分光光度計により数値化することもできる。

【００６９】

シロアリ駆除剤は、その施用現場で測定できることが望ましいことから、現場での操作が容易な測定方法の提供が望まれている。シロアリ駆除剤施用現場において、操作性に優れた簡易な測定方法あるいは測定キットの提供を目的とする本発明においては、抗体固相化担体の表面色を基準に、例えば目視で色量変化を検知することによって、定性のみならず少なくともppbオーダーレベルの定量性を確保することが可能となる。

【００７０】

さらに、試料液に係る色量変化と既知濃度のフィプロニルに係る色量変化を比較することによって、定量精度の向上を図ることができ、複数の既知濃度のフィプロニルに係る色量変化を比較することによって、さらに定量精度の向上を図ることができる。

【００７１】

目視判定を効果的に行うための具体的な手段としては、反応容器を透明な反応容器４とし、図１（Ｃ）に例示するように該反応容器４の半周分の内面あるいは図１（Ｄ）に例示

するように該反応容器４の外面に白色部材６を付加することによって、あるいは図１（Ａ）に例示するように封止部材の抗体固相化部分（スティック形状部２）を白色部材とし、反応容器を透明な反応容器４とすることによって、目視で色量変化を判別することが容易となる。また、色の濃淡は、温度や時間の経過によっても相違することがあり、特に、既知濃度のフィプロニルを封入した複数の反応容器を比較することによって、より精度の高い測定が可能となる。現地での測定も可能であり、操作性に優れたものである。

【００７２】

また、検出手段として分光光度計などを用い、上記色量変化を数値化して定量することが可能である。例えば、発色基質として３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジンを使用する場合、６５０ｎｍの吸光度を測定する。また、０．５Ｍ硫酸などで反応を停止後、４５０ｎｍの吸光度を測定してもよい。また、ｏ－フェニレンジアミンなどの他の発色基質を使用することもできる。アルカリホスファターゼを使用する場合には、例えばｐ－ニトロフェニルリン酸を発色基質として測定する方法が挙げられる。いずれの発色方法においても、既知濃度のフィプロニルを添加した反応液の吸光度と濃度の関係により作成した検量線を用いて、試料液中のフィプロニル濃度を定量することができる。

【００７３】

酵素免疫測定法以外にも、識別抗原の識別マーカーをカラーラテックスや金コロイドに置き換えた免疫測定法によって、フィプロニルを測定することができる。これらの識別抗原は、フィプロニルもしくはその誘導体にアルブミンなどのタンパク質を結合させ、このタンパク質との結合体をカラーラテックスや金コロイド表面へ公知の方法を用いて固相させることによって調製する。調製した識別抗原は、上記のＥＬＩＳＡで適用した例と同様に免疫反応容器へと封入でき、抗体を固相化した固定部材との間で抗原抗体反応させることによってフィプロニルを測定することができる。これらの免疫測定法の場合は、その後の発色操作は必要なく、抗原抗体反応中に固定部材の表面上の固相化抗体にカラーラテックスや金コロイドが結合し呈色する。この呈色の度合いを目視判定することによって、フィプロニル濃度を測定することができる。

【００７４】

検出ユニットを別に設ける場合には、反応ユニットにおいて反応した液を検出ユニットに移し替えることができる。検出ユニットは、透明な容器あるいは外面に白色部材を付加した容器などのように、目視あるいは光学的観察を容易にするような容器であることが好ましいがこれに限定されない。検出ユニットに識別抗原の基質によって発色する基質溶液を加えることで、目視あるいは光学的観察が可能となる。

【００７５】

本発明の測定キットはさらに、任意に、抽出ユニットで調製した試料液を所定比率に希釈する希釈ユニットを含んでいてもよい。希釈ユニットは、ＥＬＩＳＡが、高濃度の上記溶剤で直接測定することは困難な場合が多いために、最適な濃度範囲に希釈する手段として好ましい。希釈する為の液は、水が好適に用いられる。例えば、メタノール１００％あるいはエタノール１００％を用いて抽出ユニットで抽出した場合、稀釈率として、２～２０倍程度が好ましく、最終濃度は５～５０％程度が好適である。

【００７６】

＜本発明にかかる測定キットの例＞

土壌中のフィプロニルを測定する為の測定キットの具体例として、以下のような装置を作ることもできる。まず、一定量の溶剤を添加する注入部を有する抽出ユニットを設ける。この抽出ユニットには、測定対象たる土壌を入れることができ、注入部より溶剤を添加できるようにする。測定キットにはさらに、この抽出ユニットからフィプロニル含有試料液を移送するチューブポンプなどの移送手段；フィプロニル含有試料液と反応する抗フィプロニル抗体を固相化した固定部材と識別抗原とを有する反応ユニット；および反応ユニットで抗原抗体反応した試料液の色量変化を検出する検出ユニットが含まれる。

【００７７】

この装置では、一定量の土壌を入れることで、溶剤が自動的に注入されることとしても

よい。あるいは溶剤を別途注入することとしてもよい。その後、抽出ユニット中で混合物を撹拌等することにより、フィプロニルが抽出される。このような、抽出液の上澄みは、移送手段により反応ユニットに送られ、反応ユニット中で抗原抗体反応により反応した液が作られる。この反応液の吸光度を測定することで、土壌中のフィプロニルを定量することができる。

【００７８】

以下に、測定キット及び測定方法の具体例を実施例の態様で示すが、本発明はこれに限定されない。

【実施例１】

【００７９】

抗原および抗体の調製

（１）５－アミノ－１－（２，６－ジクロロ－４－（トリフルオロメチル）フェニル）－４－（（トリフルオロメチル）スルホニル）－１Ｈ－ピラゾール－３－カルボニトリルの合成

５－アミノ－１－（２，６－ジクロロ－４－（トリフルオロメチル）フェニル）－４－（（トリフルオロメチル）スルフィニル）－１Ｈ－ピラゾール－３－カルボニトリル０．１７ｇ（０．４ｍｍｏｌ）、タングステン酸ナトリウム二水和物０．０１ｇ（０．０３ｍｍｏｌ）、３０％過酸化水素水０．０７ｇ（０．６ｍｍｏｌ）を酢酸１ｍＬ、に溶かし、５５℃で６時間反応させた。反応液を冷却後、水１０ｍＬを加え、酢酸エチル１０ｍＬで２回抽出した。酢酸エチル層を水で洗った後、無水硫酸マグネシウムで脱水、ろ過、濃縮し、淡黄色結晶の５－アミノ－１－（２，６－ジクロロ－４－（トリフルオロメチル）フェニル）－４－（（トリフルオロメチル）スルホニル）－１Ｈ－ピラゾール－３－カルボニトリルを０．２ｇ得た。

【００８０】

（２）３－［５－アミノ－３－シアノ－１－（２，６－ジクロロ－４－トリフルオロメチルフェニル）－１Ｈ－ピラゾール－４－イルチオ］プロピオン酸の合成

５－アミノ－１－（２，６－ジクロロ－４－（トリフルオロメチル）フェニル）－４－（（トリフルオロメチル）スルホニル）－１Ｈ－ピラゾール－３－カルボニトリル０．１５ｇ（０．３３ｍｍｏｌ）をエタノール４ｍＬに溶かし、３－メルカプトプロピオン酸０．０４ｇ（０．３６ｍｍｏｌ）と炭酸カリウム０．１ｇ（０．６９ｍｍｏｌ）を加え、７０℃で１時間加熱し、その後４時間還流させた。反応液の溶媒を留去後、水を加え、１Ｎ塩酸でｐＨ３にし、酢酸エチルで２回抽出した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで脱水後、ろ過、濃縮し、シリカゲルカラム（ヘキサン：酢酸エチル＝７０：３０）で精製して、淡黄色結晶の３－［５－アミノ－３－シアノ－１－（２，６－ジクロロ－４－トリフルオロメチルフェニル）－１Ｈ－ピラゾール－４－イルチオ］プロピオン酸０．１２ｇ（収率８５．３％）を得た。

【００８１】

^{1}Ｈ ＮＭＲ （ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$） δ ２．５６（２Ｈ，ｍ，ＣＨ$_{2}$），３．２９（２Ｈ，ｍ，ＣＨ$_{2}$），７．８５（２Ｈ，ｓ，ＮＨ$_{2}$），７．９０（１Ｈ，ｓ，ＣＨ$_{2}$），８．０１（１Ｈ，ｓ，ＣＨ），１２．４（１Ｈ，ｓ，ＣＯＯＨ）

【００８２】

（３）免疫原の調製

免疫原としてウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）と上記（２）のフィプロニルハプテンとの結合体を、活性エステル法を用いて作製した。

【００８３】

（２）で製造した３－［５－アミノ－３－シアノ－１－（２，６－ジクロロ－４－トリフルオロメチルフェニル）－１Ｈ－ピラゾール－４－イルチオ］プロピオン酸（フィプロニルハプテン）２．１ｍｇ、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド１．２ｍｇおよび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塩１．９ｍｇを、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド２００μＬに溶解し、この溶液を２５℃の暗所に１．５時間放置し

フィプロニルハプテン溶液とした。

【００８４】

別途、０．１Ｍホウ酸緩衝液（ｐＨ８．０）１ｍＬにＢＳＡを１０ｍｇ加え、一晩攪拌することにより、ＢＳＡ溶液を得た。

【００８５】

このＢＳＡ溶液に、先に調製したフィプロニルハプテン溶液を徐々に滴下し、暗所にて室温で１．５時間攪拌した。反応終了後、４℃で２日間生理的リン酸緩衝液（ＰＢＳ、１０ｍＭリン酸緩衝液、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．０）に対して透析した後、－４０℃で貯蔵した。このようにして得られたフィプロニルハプテンとＢＳＡとの結合体を免疫原として使用した。

【００８６】

（４）モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

（３）で調製した免疫原を２ｍｇ／ｍＬとなるようにＰＢＳに溶解し、これに等量の完全アジュバント（商品名：フロイント完全アジュバント；ＦＣＡ）を等量混合しエマルジョン化し、その１００μＬを６～７週齢のメスのＢＡＬＢ／Ｃマウスに腹腔投与した。これと同様の手順で、不完全アジュバント（商品名：フロイント不完全アジュバント；ＦＩＣＡ）を等量混合した０．５ｍｇ／ｍＬの免疫原１００μＬを２週間毎に追加免疫した。４回の免疫後、眼底から採血し、血清中の抗体力価を間接競合法で確認した。十分に力価が高くなったことを確認し、１週間後に最終免疫として免疫原１０μｇ／１００μＬ・ＰＢＳを尾静脈から投与した。その３日後に当該マウスから脾臓を摘出し細胞融合に供した。

【００８７】

摘出した脾臓を無血清ＤＭＥＭ培地（ダルベッコ改変イーグル培地）中で余分な組織片を切除したあと、脾臓から完全に細胞を取り出し、培地中に浮遊させた。浮遊している大きな組織片を沈降させるために５分間静置、細胞浮遊液を遠沈管に集め、１５００ｒｐｍで遠心し、上清を吸引除去して、新しい無血清ＤＭＥＭを添加して細胞を浮遊させた。この操作を２回繰り返した。

【００８８】

あらかじめ培養してあったミエローマ細胞（Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８．６５３）を回収し、遠沈、上清除去、無血清ＤＭＥＭ培地で再浮遊を２回繰り返した。

【００８９】

それぞれの細胞数を計数して脾細胞とミエローマ細胞との比率が１０：１～７．５：１になるように混合し、１５００ｒｐｍで５分間遠心して，上清を吸引除去した。

【００９０】

遠沈管を激しく攪拌しながら５０％ポリエチレングリコール（分子量１５００）溶液２ｍＬを約６０秒かけて添加した。次いで約１０ｍＬの無血清ＤＭＥＭを攪拌しながら３～４分かけて添加した。

【００９１】

遠沈管を１０００ｒｐｍ，５分で遠心して上清を完全に吸引除去し、脾細胞が２．５×10^6個／ｍＬになるようにＨＴ培地（ヒポキサンチン、チミジン、１０％牛胎児血清入ＤＭＥＭ培地）に浮遊させ、９６穴培養プレートに１００μＬ／ウェル分注し、３７℃、８％炭酸ガス、加湿条件下で培養を開始した。

【００９２】

翌日に約４０μＬ／ウェルのＨＡＴ培地（ヒポキサンチン、チミジン、アミノプテリン、１０％牛胎児血清入ＤＭＥＭ培地）を添加し、ミエローマ細胞が死滅し、ハイブリドーマ細胞のコロニーが形成されるまで観察を続け、以後は細胞の状態を見ながらＨＴ培地を添加した。

【００９３】

培養開始から１０日後に培養液を採取し、間接競合阻害法でフィプロニルに対する抗体を産生しているウェルを選別し、９６ウェル、４８ウェル、２４ウェルと順次培養スケー

ルを上げた。

【００９４】

２４ウェルの段階で限界希釈法によるクローニングを行ない、フィプロニルに対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株［ＦＰＮ－１Ｅ９－２５]を得た。得られたハイブリドーマ株は、寄託番号ＦＥＲＭ ＡＰ－２０３８４の下、２００５年２月２日に独立行政法人産業技術総合研究所、特許生物寄託センターに寄託した。

【００９５】

（５）モノクローナル抗体の作製

上記のようにして得られたハイブリドーマ株を１０％牛胎児血清入りＤＭＥＭで培養し、約2×10^{6}個の細胞をＢａＬｂ／ｃ メスＲｅｔｉｒｅ マウスの腹腔内に注射し、腹水液を採取した。得られた腹水はプロテインＧ カラムによりＩｇＧ精製を行った。

【００９６】

（６）抗体の固定部材への固定化

（５）で得られたモノクローナル抗体の固定部材への固定は、二次抗体の抗マウスヤギ抗体を用いて行われた。１．６μｇ／ｍｌの二次抗体溶液中に、表面積５．２cm^{2}の板状固定化部材(図１の符号２)を入れ、４℃で一晩静置した。次に、150mM NaClを含む10mMリン酸緩衝液（ＰＢＳ）で洗浄した。この板状固定化部材を、0.4% ブロックエース入りPBSに入れ、２０℃で１時間静置した。さらに、（５）で得られたモノクローナル抗体溶液5μg/mlにスティックを入れ、２０℃で１時間静置し、洗浄後、乾燥した。以下の実施例において、このようにして得られた固定化抗体を用いた。

【実施例２】

【００９７】

ＥＬＩＳＡを応用し、各ユニットからなる測定手段を組合せたフィプロニル測定キットは、具体的には、以下の表１に例示するような試薬構成からなる。

この測定キットを用いて、フィプロニルの測定範囲を検証した。標識物量は、反応容器1本あたり0.3μｇ用いた。また、以下の反応容器の容量は、約1.8mlであった。

【表１】

ユニット	試薬構成
反応ユニット（反応容器）	凍結乾燥した西洋ワサビペルオキシダーゼ結合フィプロニル誘導体を含有
固定部材（抗体スティック）	抗フィプロニル抗体を固相化し、ブロッキング後風乾
検出ユニット（発色試薬）	発色試薬として、3，3’，5，5’ーテトラメチルベンジジン溶液を含有

【００９８】

（１）標準液の調製

メタノールでフィプロニル標準試薬（和光純薬製）を溶解後、５％メタノール溶液となるように精製水で希釈し、０．００５０、０．０１０、０．０２０、０．０８０、０．２０ｐｐｍの標準希釈列を調製した。

【００９９】

（２）抗原抗体反応

各標準液１ｍＬを反応容器に加えて、予め封入されている識別抗原を溶解混合した。直ちに、抗体スティックを反応容器に装着し、２５℃で１０分間抗原抗体反応を行った。

【０１００】

（３）色量変化の検出

反応容器と抗体スティックを水道水で洗浄し、固相化抗体と結合しなかった識別抗原を除去した。洗浄液の残液を充分に除去した後、発色試薬を反応容器に加え抗体スティックを装着し、各１０分間発色反応させた後６５０ｎｍの吸光度を求めた。その結果、図２に示したように、０．００５０～０．０８０ｐｐｍまでほぼ直線的な標準曲線でフィプロニ

ルを測定できることが判った。従って、この測定範囲であれば、目視判定も可能であると考えられた。

【実施例３】

【０１０１】

次に、土壌中のフィプロニルを測定するための測定キット及び測定方法の具体例を挙げる。各ユニットからなる測定手段を組合せたフィプロニル測定キットは、以下の表２に例示するような試薬構成からなる。この測定キットを用いて、実際に土壌中のフィプロニルの測定を行った。標識物量は、反応容器1本あたり0.3μｇ用いた。また、以下の反応容器の容量は、約1.8mlであった。

【表２】

ユニット	試薬構成
抽出ユニット（抽出ボトル）	５mLの５０%メタノール含有
溶解試薬	5%メタノール含有
反応ユニット（反応容器）	凍結乾燥した西洋ワサビペルオキシダーゼ結合フィプロニル誘導体を含有
固定部材（抗体スティック）	抗フィプロニル抗体を固相化し、ブロッキング後風乾
検出ユニット（発色試薬）	発色試薬として、3，3’，5，5’ーテトラメチルベンジジン溶液を含有

【０１０２】

（１）試料液の調製

試料土壌（１ｐｐｍのフィプロニルと１０%の有機質を含有）１ｇを秤量後、抽出容器に移して５ｍＬの５０%メタノール中で１分間攪拌し、その中に含まれるフィプロニルを抽出した。さらに、抽出容器中へ水道水を加えて５０ｍＬの混合液とし、その上澄みを試料液とした。

【０１０３】

（２）抗原抗体反応

試料液あるいは前記標準液の１ｍＬを、反応容器に加えて予め封入されている識別抗原を溶解混合した。直ちに、抗体スティックを反応容器に装着し、２５℃で１０分間抗原抗体反応を行った。

【０１０４】

（３）色量変化の検出

反応容器と抗体スティックを水道水で洗浄し、固相化抗体と結合しなかった識別抗原を除去した。洗浄液の残液を充分に除去した後、発色試薬を反応容器に加え抗体スティックを装着し、各１０分間発色反応させた後、抗体ステッィクを反応容器から外し、反応容器中の発色反応後の液体について、分光光度計を用いて６５０ｎｍの吸光度を求めた。

【０１０５】

標準液を用いて検量線を作成し、試料土壌中から回収されるフィプロニルの濃度を求めた。その結果、フィプロニル濃度が１ｐｐｍと良好に土壌中のフィプロニルを測定できた。

【実施例４】

【０１０６】

次に、土壌中のフィプロニルを目視判定するための測定キット及び測定方法の具体例を挙げる。各ユニットからなる測定手段を組合せたフィプロニル測定キットは、以下の表３に例示するような試薬構成からなる。標識物量は、反応容器1本あたり0.3μｇ用いた。また、以下の反応容器の容量は、約1.8mlであった。この測定キットを用いて、土壌中のフィプロニル濃度を目視判定する手順を説明する。

【表３】

ユニットおよび試薬構成	容量	数量
抽出ボトル（５mLの５０%メタノール含有）	５０mL	１本
溶解試薬（５%メタノール含有）	３mL	１本
反応容器（凍結乾燥した西洋ワサビペルオキシダーゼ結合フィプロニル誘導体を含有） Ａ：陰性コントロール用（フィプロニル０ｐｐｍ） Ｂ：陽性コントロール用（フィプロニル０．０２０ｐｐｍを含有） Ｃ：試料測定用	各１mL	各１本
抗体スティック（抗フィプロニル抗体を固相化し、ブロッキング後風乾）	－	３本
発色試薬（３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン溶液を含有）	４mL	１本

【０１０７】

（１）試料液の調製

試料土壌（１ｐｐｍのフィプロニルと１０%の有機質を含有）１ｇを秤量後、抽出容器に移して５ｍＬの５０%メタノール中で１分間攪拌し、その中に含まれるフィプロニルを抽出した。さらに、抽出容器中へ水道水を加えて５０ｍＬの混合液とし、その上澄みを試料液とした。

【０１０８】

（２）抗原抗体反応

溶解試薬１ｍＬを反応容器Ａ及びＢに加え、試料液１ｍＬを反応容器Ｃに加えて予め封入されている識別抗原（Ｂの場合はフィプロニルを含む）を溶解混合した。直ちに、抗体スティックを反応容器に装着し、２５℃で１０分間抗原抗体反応を行った。

【０１０９】

（３）色量変化の検出

反応容器と抗体スティックを水道水で洗浄し、固相化抗体と結合しなかった識別抗原を除去した。洗浄液の残液を充分に除去した後、発色試薬を反応容器に加え抗体スティックを装着し、各１０分間発色反応させた後目視判定した。その結果、データは示さないが、試料土壌について、陽性コントロール（フィプロニル０．０２０ｐｐｍを含有；土壌中フィプロニル濃度として１．０ｐｐｍに相当）と同じ発色程度を示し、フィプロニル濃度１ｐｐｍを基準として土壌中のフィプロニル濃度を定性判定できることがわかった。

【実施例５】

【０１１０】

次に、土壌中のフィプロニルを測定するための測定キット及び測定方法の他の具体例を挙げる。各ユニットからなる測定手段を組合せたフィプロニル測定キットは、以下の表４に例示するような試薬構成からなる。この測定キットを用いて、土壌中のフィプロニル濃度を目視判定する手順を説明する。ここで用いたフィプロニルは、マイクロカプセルとして製剤化されたものである。標識物量は、反応容器1本あたり0.3μｇ用いた。また、以下の反応容器の容量は、約1.8mlであった。

【表４】

ユニットおよび試薬構成	容量	数量
抽出ボトル（３ｍＬの無水エタノール含有）	５０ｍＬ	１本
溶解試薬（６％エタノール含有）	３ｍＬ	１本
反応容器（凍結乾燥した西洋ワサビペルオキシダーゼ結合フィプロニル誘導体を含有） Ａ：陰性コントロール用（フィプロニル０ｐｐｍ） Ｂ：陽性コントロール用（フィプロニル０．０２０ｐｐｍを含有） Ｃ：試料測定用	各１ｍＬ	各１本
抗体スティック（抗フィプロニル抗体を固相化し、ブロッキング後風乾）	－	３本
発色試薬（３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン溶液を含有）	４ｍＬ	１本

【０１１１】

（１）試料液の調製

試料土壌（マイクロカプセル製剤化されたフィプロニル（フィプロニルにして１ｐｐｍ相当）と１０％の有機質を含有）１ｇを秤量後、抽出容器に移して３ｍＬの１００％エタノール中で１分間攪拌し、その中に含まれるフィプロニルを抽出した。さらに、抽出容器中へ水道水を加えて５０ｍＬの混合液とし、その上澄みを試料液とした。

【０１１２】

（２）抗原抗体反応

溶解試薬１ｍＬを反応容器Ａ及びＢに加え、試料液１ｍＬを反応容器Ｃに加えて予め封入されている識別抗原（Ｂの場合はフィプロニルを含む）を溶解混合した。直ちに、抗体スティックを反応容器に装着し、２５℃で１０分間抗原抗体反応を行った。

【０１１３】

（３）色量変化の検出

反応容器と抗体スティックを水道水で洗浄し、固相化抗体と結合しなかった識別抗原を除去した。洗浄液の残液を充分に除去した後、発色試薬を反応容器に加え抗体スティックを装着し、各１０分間発色反応させた後目視判定した。その結果、データは示さないが、試料土壌について、陽性コントロール（フィプロニル０．０２０ｐｐｍを含有；土壌中フィプロニル濃度として１．０ｐｐｍに相当）と同じ発色程度を示し、フィプロニル濃度１ｐｐｍを基準として土壌中のフィプロニル濃度を定性判定できることがわかった。

【０１１４】

実施例５においては、色量変化の検出を目視判定で行っているが、実施例２と同様に発色反応後６５０ｎｍの吸光度を求めることで行ってもよい。

【０１１５】

以上、ＥＬＩＳＡによるシロアリ駆除剤フィプロニルの残留量を検出する測定キットについて、具体的な構成例を基に説明を行ったが、本発明はこれらの例に限定されるものでないことはいうまでもない。

【図面の簡単な説明】

【０１１６】

【図１】本発明に係る反応容器の具体例を示す説明図。

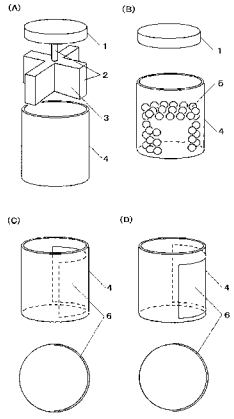
【図２】本発明に係る測定キットでフィプロニルを測定した標準曲線。

【符号の説明】

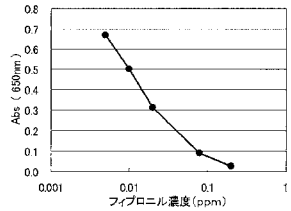
【０１１７】

１　封止部材（蓋状部）
２　固定部材（スティック形状部）
３　先端部
４　反応容器
５　担体
６　白色部材

【図１】


(A)
(B)
(C)
(D)
1
2
3
4
5
6

【図２】

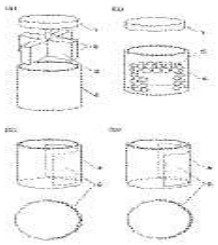

0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Abs（650nm）
0.001
0.01
0.1
1
フィプロニル濃度(ppm)

フロントページの続き

(72)発明者　三宅　司郎
京都府京都市南区吉祥院宮の東町２番地　株式会社堀場製作所内
(72)発明者　内ヶ島　美岐子
京都府京都市南区吉祥院宮の東町２番地　株式会社堀場製作所内
(72)発明者　門脇　篤
京都府京都市南区吉祥院宮の東町２番地　株式会社堀場製作所内

Ｆターム(参考) 2G054 AB07　BB01　CA30　EA04　EA06　GA03

专利名称(译)	使用免疫测定法测量氟虫腈的测量试剂盒		
公开(公告)号	JP2007187650A	公开(公告)日	2007-07-26
申请号	JP2006309332	申请日	2006-11-15
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社堀场制作所 拜耳作物科学		
申请(专利权)人(译)	株式会社堀场制作所 拜耳作物科学		
[标]发明人	三宅司郎 内ヶ島美岐子 門脇篤		
发明人	三宅 司郎 内ヶ島 美岐子 門脇 篤		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N21/78		
FI分类号	G01N33/53.S G01N33/543.511.H G01N21/78.Z		
F-TERM分类号	2G054/AB07 2G054/BB01 2G054/CA30 2G054/EA04 2G054/EA06 2G054/GA03		
代理人(译)	Kajisaki浩一 尾崎雄三 谷口俊彦 现在树高尾		
优先权	2005363166 2005-12-16 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种在现场测量氟虫腈的免疫分析方法及其试剂盒中测定氟虫腈的方法，该方法的操作性极好。 通过免疫测定法测定氟虫腈的试剂盒，其包括（1）提取单元，用于使用溶剂从待测样品中提取氟虫腈，（2）封闭有鉴定抗原的反应容器，和 一种反应单元，其包括用于固定氟虫腈抗体的固定构件和可装配至反应容器中并通过使样品或样品稀释剂接触而进行抗原-抗体反应的密封构件，并且可选地，（3）反应的结果，用于视觉或光学地检测取决于测量对象中氟虫腈浓度的变化的检测单元，和（4）用于将样品溶液稀释至预定比例的稀释单元。 提供具有该测量套件的测量套件。 [选型图]图1