

(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 - 195999

(P2002 - 195999A)

(43)公開日 平成14年7月10日(2002.7.10)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53			G 0 1 N 33/53	S
33/00			33/00	D

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 7 数)

(21)出願番号 特願2000 - 397057(P2000 - 397057)

(22)出願日 平成12年12月27日(2000.12.27)

(71)出願人 000237204

富士レビオ株式会社

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号

(72)発明者 大村 正史

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号 富

士レビオ株式会社内

(72)発明者 丹羽 敏博

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号 富

士レビオ株式会社内

(74)代理人 100098431

弁理士 山中 郁生 (外3名)

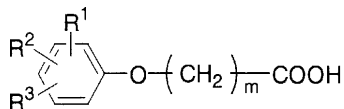
(54)【発明の名称】 有機ハロゲン化合物の免疫測定方法

(57)【要約】

【課題】 従来の煩雑な測定法に替わる P C B やダイオキシンなどの広汎な有機ハロゲン化合物を酵素免疫測定法で測定する方法の提供。

【解決手段】 一般式

【化1】

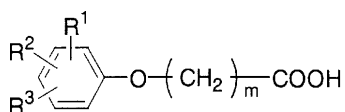


(式中、R¹およびR²はフッ素原子、臭素原子またはトリフルオロメチル基、R³は水素原子またはR¹のいずれかの基であり、mは5ないし7の整数である。)で表されるカルボン酸を固相结合抗原または標識抗原の抗原として用いることにより、免疫測定法により有機ハロゲン化合物を測定することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式

【化1】



で表されるカルボン酸を、固相结合抗原または標識抗原の抗原として用いる有機ハロゲン化合物の免疫測定方法（式中、 R^1 および R^2 はフッ素原子、臭素原子またはトリフルオロメチル基、 R^3 は水素原子または R^1 のいずれかの基であり、 m は5ないし7の整数である。）。

【請求項2】 m が5である請求項1に記載の免疫測定方法。

【請求項3】 R^1 および R^2 がフッ素原子、 R^3 が水素原子である請求項1または2に記載の免疫測定方法。

【請求項4】 R^1 、 R^2 および R^3 がフッ素原子である請求項1または2に記載の免疫測定方法。

【請求項5】 R^1 および R^2 が臭素原子、 R^3 が水素原子である請求項1または2に記載の免疫測定方法。

【請求項6】 R^1 、 R^2 および R^3 が臭素原子である請求項1または2に記載の免疫測定方法。

【請求項7】 R^1 および R^2 がトリフルオロメチル基、 R^3 が水素原子である請求項1または2に記載の免疫測定方法。

【請求項8】 固相に結合された請求項1ないし7のいずれかに記載の化合物と、検体中の有機ハロゲン化合物との競合反応を利用する、請求項1に記載の免疫測定方法。

【請求項9】 請求項1ないし7のいずれかに記載の化合物が、キャリアープロテインを介して結合している抗原結合固相を用いる請求項5に記載の免疫測定方法。

【請求項10】 標識された請求項1ないし7のいずれかに記載の化合物と、検体中の有機ハロゲン化合物との競合反応を利用する、請求項1に記載の免疫測定方法。

【請求項11】 有機ハロゲン化合物が、PCBまたはダイオキシンである請求項1ないし10のいずれかに記載の免疫測定方法。

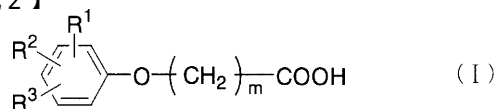
【請求項12】 請求項1ないし11のいずれかに記載の免疫測定方法を実施するための免疫測定キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、一般式

【化2】



（式中、 R^1 および R^2 はフッ素原子、臭素原子またはトリフルオロメチル基、 R^3 は水素原子または R^1 のいずれかの基であり、 m は5ないし7の整数である。）で表されるカルボン酸を用いる有機ハロゲン化合物の免疫測定方法であり、該カルボン酸は、PCBやダイオキシンなどの有機ハロゲン化合物を測定する際の固相结合抗原の抗原、または標識抗原の抗原として使用することができる。

【0002】

【従来の技術】従来、PCBやダイオキシンは、ガスクロマトグラフィーとマススペクトロメトリーとを一体化した機器等を用いて測定していたが、これらの測定機器は大変高価であり、また、サンプルが土や水の場合は、これら機器測定前に濃縮操作を行わねばならず、煩雑であった。これらの問題は免疫測定法を採用することで解決することができた。この方法は、迅速かつ簡便、低コストで高感度測定ができるが、測定対象の物質が限定的であり、改良が望まれていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、簡便な有機ハロゲン化合物の測定方法を提供することが目的である。さらに、本発明は広範な有機ハロゲン化合物の測定方法を提供することが目的である。

【0004】

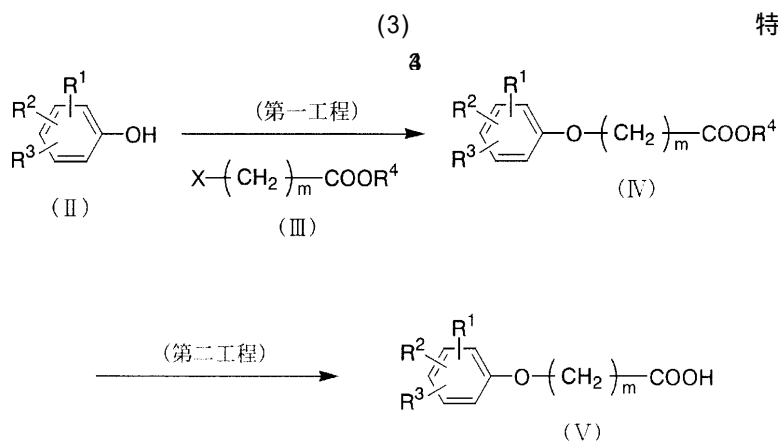
【課題を解決するための手段】かかる課題を解決するため本発明者らは、新規な前記一般式（I）で表されるカルボン酸を見出し、さらに、該カルボン酸を用いるとPCBやダイオキシンなどの有機ハロゲン化合物を免疫測定法により広汎に測定できることを見出して、本発明を完成した。

【0005】

【発明の実施の形態】本発明の前記一般式（I）で表されるカルボン酸は、以下の式に従い製造することができる。

【0006】

【化3】



【0007】(式中、 R^1 および R^2 はフッ素原子、臭素原子またはトリフルオロメチル基、 R^3 は水素原子または R^1 のいずれかの基、 R^4 はアルキル基またはアリール基、 m は5ないし7の整数である。Xはハロゲン原子である。)

【0008】(第一工程)本工程は、前記一般式(IV)で表わされるエステル誘導体を、一般式(II)で表される置換フェノールと一般式(III)で表されるハロ脂肪酸エステルとを塩基の存在下、反応させることにより製造する工程である。

【0009】前記一般式(II)で表される置換フェノールとしては、たとえば、ジフルオロフェノール、ジプロモフェノール、ビストリフルオロメチルフェノール、ブromo-フルオロフェノール、フルオロ-トリフルオロメチルフェノール、ブromo-トリフルオロメチルフェノール、トリフルオロフェノール、トリプロモフェノール、トリストリフルオロメチルフェノール、ブromo-ジフルオロフェノール、ジブromo-フルオロフェノール等を挙げることができる。また、一般式(III)で表されるハロ脂肪酸エステルとしては、たとえば、6-ブromoヘキサ酸エチル、6-ブromoヘキサ酸メチル、6-ブromoヘキサ酸t-ブチル、7-ブromoヘプタン酸エチル、7-ブromoヘプタン酸メチル、7-ブromoヘプタン酸t-ブチル、8-ブromoオクタン酸エチル、8-ブromoオクタン酸メチル、8-ブromoオクタン酸t-ブチル、6-クロロヘキサ酸エチル、6-クロロヘキサ酸メチル、6-クロロヘキサ酸t-ブチル、7-クロロヘプタン酸エチル、7-クロロヘプタン酸メチル、7-クロロヘプタン酸t-ブチル、8-クロロオクタン酸エチル、8-クロロオクタン酸メチル、8-クロロオクタン酸t-ブチルなどを使用することができる。

【0010】(第二工程)本工程は、一般式(IV)で表わされる化合物を加水分解することにより、一般式(V)で表わされるカルボン酸を製造する工程である。

【0011】本発明は、前記一般式(I)で表されるカルボン酸を用いて、免疫測定方法により有機ハロゲン化合物を測定するものである。本発明の競合反応法は、測定対象物質である有機ハロゲン化合物を認識する抗体と、検体中の有機ハロゲン化合物と、試薬として用いる

前記一般式(I)で表されるカルボン酸とを競合させることを基本原理とする免疫測定方法であり、固相结合抗原を用いる方法と固相结合抗体を用いる方法との2通りがある。すなわち、固相に結合したカルボン酸と標識抗体と検体とを競合反応させ、固相に結合した標識抗体量に基づく応答を測定したり、固相结合抗体と標識されたカルボン酸と検体とを競合反応させ、固相に結合した標識抗原(標識されたカルボン酸)量に基づく応答を測定する等の方法を意味する。

10 【0012】前記一般式(I)で表されるカルボン酸と、キャリアープロテインまたは標識物質とを結合させるには、共有結合が好ましく、該結合には公知の技術に適宜用いることができる。結合方法としては、例えば、活性エステル法、混合酸無水物法、縮合剤を用いる方法などが挙げられる。

ここで、活性エステル法に用いるエステルとしては、例えば、ヒドロキシスクシニミドエステル、N-ヒドロキシフタルイミドエステル、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシミドエステル等のN-ヒドロキシアミン系活性エステル、p-ニトロフェニルエステル、ペンタクロロフェニルエステル、2,4,5-トリクロロフェニルエステル等のo-, p-位に電子吸引性の置換基の入ったフェニルエステル系活性エステル、8-ヒドロキシキノリルエステル、5-クロロ-8-ヒドロキシキノリルエステル等の二価官能性活性エステルなどを挙げることができるが、操作性の面からヒドロキシスクシニミドエステルが好ましい。

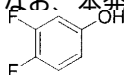
また、縮合剤としては、DCC(N,N-Dicyclohexyl carbodiimide)、CMC(1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbodiimide)、DIC(Diisopropyl carbodiimide)、WSC(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride)、Woodward's Reagent K(N-ethyl-3-phenylisoxazolium-3'-sulfonate)、CDI(N,N-Carbonyldiimidazole)などを挙げることができる。

【0013】本発明の免疫測定に用いる標識物質は、標識物質を検出する応答を与える物質であり、例えば、酵素、放射性同位元素、蛍光物質、発光物質等が挙げられるが、測定対象が有機ハロゲン化合物であることから、

酵素を採用することが好ましい。

酵素標識抗体の酵素としては、測定系により影響のない酵素、例えば、アルカリフォスファターゼ等を使用できる。

【0014】本発明に使用するキャリアープロテインとしては、KLH、BSA等を挙げることができ、有機ハロゲン化合物を認識する抗体は、本発明を実施することができる抗体ならばいずれの抗体でもよいが、WO99/43799に記載のモノクローナル抗体は、感度を向上させる上からも好ましい。なお、本発明により測定で*



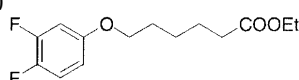
*きる有機ハロゲン化合物は、PCB、ダイオキシン等である。

【0015】以下、参考例及び実施例により本発明をさらに詳細を説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0016】参考例1 6-(3,4-ジフルオロフェノキシ)ヘキサン酸エチルの合成

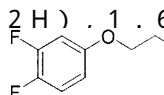
【0017】

【化4】



【0018】アルゴン気流下、3,4-ジフルオロフェノール650mg(5.00mmol)の無水ジメチルホルムアミド溶液(15ml)に60%油性水素化ナトリウム200mg(5.00mmol)を加え、室温で15分間撹拌した。続いて6-ブロモヘキサン酸エチル445μl(2.50mmol)を加え、室温で24時間撹拌した。反応終了後、10%クエン酸水溶液で弱酸性とした後、酢酸エチルで抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン-酢酸エチル=20:1)で精製し、6-(3,4-ジフルオロフェノキシ)ヘキサン酸エチル537mg(収率78.8%)を得た。

【0019】¹H-NMR(400MHz, CDC1₃): 1.26(t, J=7.1Hz, 3H), 1.45~1.53(m, 2H), 1.60~1.74



(m, 2H), 1.74~1.82(m, 2H), 2.33(t, J=7.4Hz, 2H), 3.89(t, J=6.3Hz, 2H), 4.13(q, J=7.1Hz, 2H), 6.54~6.59(m, 1H), 6.66~6.72(m, 1H), 7.00~7.08(m, 1H) ppm.

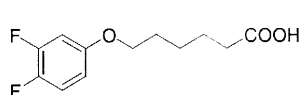
IR(liquid film): 2948, 1736, 1608, 1518, 1256, 1214, 1162 cm⁻¹

Mass(m/z, %): 272(M⁺, 24), 227(22), 143(100), 130(47), 115(32), 97(67), 69(63).

【0020】参考例2 6-(3,4-ジフルオロフェノキシ)ヘキサン酸の合成

【0021】

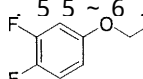
【化5】



【0022】6-(3,4-ジフルオロフェノキシ)ヘキサン酸エチル336mg(1.23mmol)を酢酸3mlに溶解し、濃塩酸2mlを加え、3時間加熱環流した。反応終了後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液中で中和し、析出した結晶を濾取した。エーテル-ヘキサンから再結晶し、6-(3,4-ジフルオロフェノキシ)ヘキサン酸193mg(収率63.9%)を得た。

【0023】mp: 65.0~66.0

¹H-NMR(400MHz, CDC1₃): 1.48~1.57(m, 2H), 1.67~1.76(m, 2H), 1.76~1.83(m, 2H), 2.40(t, J=7.4Hz, 2H), 3.90(t, J=6.3Hz, 2H), 6.55~6.59(m, 1



H), 6.66~6.72(m, 1H), 7.00~7.08(m, 1H) ppm.

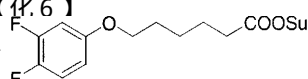
IR(KBr): 3064, 2960, 1714, 1614, 1520, 1436, 1306, 1206, 1164, 1124 cm⁻¹

Mass(m/z, %): 244(M⁺, 60), 130(100), 115(86), 97(56), 69(70).

【0024】参考例3 N-スクシンイミジル-6-(3,4-ジフルオロフェノキシ)ヘキサノエートの合成

【0025】

【化6】



【0026】6-(3,4-ジフルオロフェノキシ)ヘキサン酸899mg(3.68mmol)の無水ジクロ

ロメタン溶液(20ml)に、N-ヒドロキシスクシンイミド508mg(4.42mmol)、塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド847mg(4.42mmol)を加え、室温で18時間攪拌した。反応終了後、10%クエン酸水溶液で弱酸性とした後、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサノ-酢酸エチル=1:1)で精製し、N-スクシンイミジル-6-(3,4-ジフルオロフェノキシ)ヘキサノエート1.11g(収率88.1%)を得た。

【0027】¹H-NMR(400MHz, CDC l₃): 1.56~1.64(m, 2H), 1.77~1.87(m, 4H), 2.65(t, J=7.4Hz, 2H), 2.84(bs, 4H), 3.91(t, J=6.2Hz, 2H), 6.55~6.60(m, 1H), 6.67~6.73(m, 1H), 7.00~7.08(m, 1H) ppm.

IR(liquid film): 2948, 1816, 1788, 1742, 1608, 1518, 1212, 1162, 1070 cm⁻¹

Mass(m/z, %): 341(M⁺, 85), 227(61), 130(56), 97(100), 69(94).

【0028】参考例4 ウシ血清アルブミン(BSA)結合3,4-ジフルオロフェノキシ誘導体の合成
ウシ血清アルブミン5.0mgを0.1Mのリン酸緩衝液(pH7.5)900μlに溶解し、N-スクシンイミジル-6-(3,4-ジフルオロフェノキシ)ヘキサノエート1.0mgの無水ジメチルホルムアミド溶液100μlを加え、室温で5時間攪拌した。その後反応液をPBS中で透析し脱塩して、標記BSA結合3,4-ジフルオロフェノキシ誘導体を得た。

【0029】参考例5 ウシ血清アルブミン結合3,4-ジフルオロフェノキシ誘導体感作粒子の作成
カルボキシル化粒子(日本ペイント社製)を0.1Mリン酸緩衝液(pH5.0)にて3回洗浄し、同緩衝液1mlにて懸濁後、5~40μg/mlに調整した参考例4で作成したBSA結合3,4-ジフルオロフェノキシ誘導体溶液1mlを添加し25~2時間、ローテーターにて回転反応させた。粒子洗浄後、0.05Mメス緩衝液(pH5.5)1mlに懸濁し、80m

g/mlの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(ナカライタスク社製)水溶液を50μl添加して、ローテーターで25~30分回転反応させた。粒子を洗浄後、ポストコート緩衝液を2ml添加しローテーターで37℃一晩回転反応させた。粒子を洗浄後、粒子濃度を1.5%に合わせてウシ血清アルブミン結合3,4-ジフルオロフェノキシ誘導体感作粒子を得た。

【0030】参考例6 アルカリフォスファターゼ(ALP)標識抗PCB#169(3,3',4,4',5,5'-ヘキサクロロビフェニル)抗体の作成
抗PCB#169モノクローナル抗体(PCB169E抗体;KRI社製)を用い、マレイミド法にてアルカリフォスファターゼ(オリエンタル社製)を結合しALP標識抗PCB#169抗体を得た。

【0031】実施例1 PCB#169の測定
PCB#169の測定は、全自動化学発光免疫測定システム(ルミパルスf;富士レビオ社製)を用いた1ステップ競合法にて行った。参考例5で作成したウシ血清アルブミン結合3,4-ジフルオロフェノキシ誘導体感作粒子150μlにPCB#169の標準抗原液90μlとALP標識抗PCB#169抗体液50μlを加え、37℃20分間免疫反応を行い、洗浄後基質(AMPPD)液200μlを加えて37℃5分間酵素反応を行い、その後発光量を測定した。

【0032】前記PCB#169の標準抗原液は、PCB#169(ジールサイエンス社製)を10%ジメチルスルホキシド溶液に溶解し、0~10ng/mlの濃度に調整した。標準抗原0濃度のカウント値を100%としたときの各標準抗原液の応答(B/B0(%))で標準曲線を求めた。その結果を図1に示す。

【0033】また、ウシ血清アルブミン結合3,4-ジフルオロフェノキシ誘導体感作粒子を用いたPCB#169測定系に対するPCB同族体の交叉反応性と、比較的毒性の高い(毒性等価係数;TEF0.1以上)ダイオキシン11種との交叉反応性の測定結果を表1および表2に示す。その結果、PCB#169測定系では、PCBおよびダイオキシンの同族体と多数交叉反応性を示した。

【0034】

【表1】

910
PCB同族体の交叉反応性*

PCB	BSA結合3,4ジフルオロフェノキシ誘導体	
	PCB#169測定系	
3,3',4,4'-TCB(77)		8.8
3,4,4',5'-TCB(81)		4.8
2,3,3',4,4'-PeCB(105)		-
2,3,4,4',5'-PeCB(114)		-
2,3',4,4',5'-PeCB(118)		-
2',3,4,4',5'-PeCB(123)		-
3,3',4,4',5'-PeCB(126)		37.8
2,3,3',4,4',5'-HxCB(156)		-
2,3,3',4,4',5'-HxCB(157)		-
2,3',4,4',5,5'-HxCB(167)		-
3,3',4,4',5,5'-HxCB(169)		-
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB(189)		-

*50%阻害率の濃度の割合から求めた(単位 %)

【0035】

* * 【表2】
PCB#169測定系に対するDioxinの交叉反応性*

Dioxine	BSA結合3,4ジフルオロフェノキシ誘導体	
	PCB#169測定系	
2,3,7,8-TCDD		-
1,2,3,7,8-PeCDD		20.2
1,2,3,4,7,8-HeCDD		-
1,2,3,6,7,8-HeCDD		6.6
1,2,3,7,8,9-HeCDD		-
2,3,7,8-TCDF		1.6
2,3,4,7,8-PeCDF		62.3
1,2,3,4,7,8-HeCDF		-
1,2,3,6,7,8-HeCDF		3.0
1,2,3,7,8,9-HeCDF		-
2,3,4,6,7,8-HeCDF		10.5

*50%阻害率の濃度の割合から求めた(単位 %)

【0036】

【発明の効果】本発明の一般式(I)で表される置換フェノキシカルボン酸は、PCB等の有機ハロゲン化合物を測定するための試薬として有用である。本発明の一般式(I)で表される置換フェノキシカルボン酸は、例えばBSAと結合させて、酵素免疫測定法によるPCBや

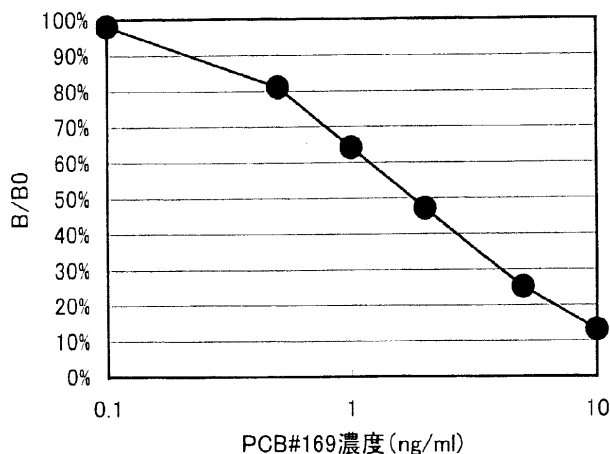
ダイオキシン等の有機ハロゲン化合物の測定に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】PCB#169を測定したときの標準曲線を示す。

【図1】

PCB#169 STD Assay



【手続補正書】

【提出日】平成13年2月20日(2001.2.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正内容】

【0014】本発明に使用するキャリアープロテインと

しては、KLH、BSA等を挙げる事ができ、有機ハロゲン化合物を認識する抗体は、本発明を実施することができる抗体ならばいずれの抗体でもよいが、特開2000-191699に記載のモノクローナル抗体は、感度を向上させる上からも好ましい。なお、本発明により測定できる有機ハロゲン化合物は、PCB、ダイオキシン等である。

专利名称(译)	有机卤素化合物的免疫测定方法		
公开(公告)号	JP2002195999A	公开(公告)日	2002-07-10
申请号	JP2000397057	申请日	2000-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO		
[标]发明人	大村正史 丹羽敏博		
发明人	大村 正史 丹羽 敏博		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/00		
FI分类号	G01N33/53.S G01N33/00.D		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种通过酶免疫测定而不是传统的复杂测量方法测量多种有机卤素化合物（如PCB和二恶英）的方法。溶液：由通式表示的化合物：（其中R¹且R²是氟原子，溴原子或三氟甲基，R³是氢原子或R¹，并且m是5至7的整数）用作固相结合抗原或标记抗原的抗原，由此免疫测定方法可以测量有机卤素化合物。

