

(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 - 277466

(P2002 - 277466A)

(43)公開日 平成14年9月25日(2002.9.25)

(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
	33/531		33/531	A

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 8 数)

(21)出願番号 特願2001 - 73965(P2001 - 73965)

(22)出願日 平成13年3月15日(2001.3.15)

(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)

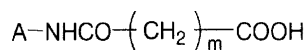
(54)【発明の名称】 有機塩素化合物の免疫測定方法

(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塩素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】

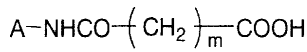


(式中、Aは、ジアルキル置換のフェニル基、またはトリハロゲン置換のフェニル基であり、mは3ないし5の整数である。)で表されるカルボン酸を固相結合抗原または標識抗原の抗原として用いることにより、免疫測定法により有機塩素化合物を測定することができる。

【特許請求の範囲】

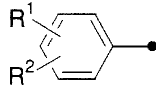
【請求項 1】 一般式

【化 1】



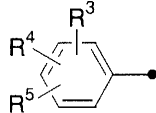
で表されるカルボン酸を、固相结合抗原または標識抗原の抗原として用いる有機塩素化合物の免疫測定方法（式中、Aは

【化 2】



で表される基（式中、R¹およびR²は低級アルキル基。）または

【化 3】

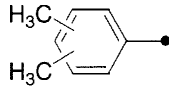


で表される基（式中、R³、R⁴およびR⁵はハロゲン原子。）であり、mは3ないし5の整数である。）。

【請求項 2】 mが3である請求項 1 に記載の免疫測定方法。

【請求項 3】 Aが

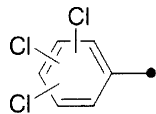
【化 4】



で表される基である請求項 1 または 2 に記載の免疫測定方法。

【請求項 4】 Aが

【化 5】



で表される基である請求項 1 または 2 に記載の免疫測定方法。

【請求項 5】 固相に結合された請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の化合物と、検体中の有機塩素化合物との競合反応を利用する、請求項 1 記載の免疫測定方法。

【請求項 6】 請求項 1 ないし 4 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 記載の免疫測定方法。

【請求項 7】 標識された請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の化合物と、検体中の有機塩素化合物との競合反応を利用する、請求項 1 記載の免疫測定方法。

【請求項 8】 有機塩素化合物が、PCBおよびダイオキシン類からなる群から選択される 1 種または 2 種以上の化合物である請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載の免

疫測定方法。

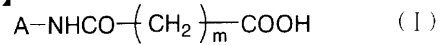
【請求項 9】 請求項 1 ないし 8 のいずれかに記載の免疫測定方法を実施するための免疫測定キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

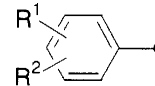
【発明の属する技術分野】本発明は、一般式

【化 6】



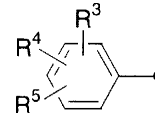
10 (式中、Aは

【化 7】



で表される基（式中、R¹およびR²は低級アルキル基。）または

【化 8】



で表される基（式中、R³、R⁴およびR⁵はハロゲン原子。）であり、mは3ないし5の整数である。）で表されるカルボン酸を用いる有機塩素化合物の免疫測定方法であり、該カルボン酸は、PCBやダイオキシン類などの有機塩素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やダイオキシン類は、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】

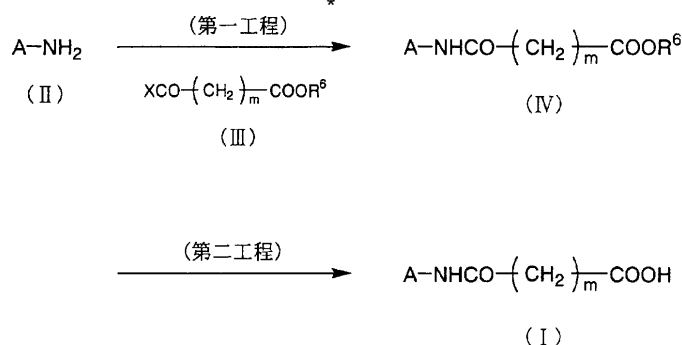
【発明が解決しようとする課題】本発明は、簡便な有機塩素化合物の測定方法を提供することが目的である。さらに、本発明は広範な有機塩素化合物の測定方法を提供することが目的である。

【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やダイオキシン類などの有機塩素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。

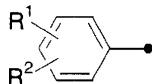


*【0006】

【化9】

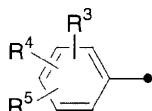
【0007】(式中、Aは

【化10】



で表される基(式中、R¹およびR²は低級アルキル基。)または

【化11】



で表される基(式中、R³、R⁴およびR⁵はハロゲン原子。)、R⁶はアルキル基またはアリール基、mは3ないし5の整数である。Xはハロゲン原子である。)本発明を説明するにあたって、「アルキル基」とは、炭素原子数1~12の直鎖状、分枝鎖状または環状のアルキル基のいずれでもよく、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、1-メチルエチル基、シクロプロピル基、n-ブチル基、2-メチルプロピル基、1-メチルプロピル基、1,1-ジメチルエチル基、シクロブチル基、n-ペンチル基、3-メチルブチル基、シクロペンチル基、2,2-ジメチルプロピル基、1-メチルシクロブチル基、シクロブチルメチル基、n-ヘキシル基、4-メチルペンチル基、シクロヘキシル基、1-メチルシクロペンチル基、シクロペンチルメチル基、(1-メチルシクロブチル)メチル基、n-ヘプチル基、5-メチルヘキシル基、4,4-ジメチルペンチル基、シクロヘプチル基、シクロヘキシルメチル基、(1-メチルシクロペンチル)メチル基、n-オクチル基、6-メチルヘプチル基、5,5-ジメチルヘキシル基、(1-メチルシクロヘキシル)メチル基、n-ノニル基、7-メチルオクチル基、6,6-ジメチルヘプチル基、n-デシル基、8-メチルノニル基、7,7-ジメチルオクチル基、n-インデカシル基、9-メチルデシル基、8,8-ジメチルノニル基、n-ドデカシル基、10-メチルウンデカシル基、9,9-ジメチルデカシル基等を挙げ

ることできる。また、「アルキル基」は置換基を有していてもよく、置換基としてはフェニル基等の芳香族炭化水素基を挙げることができる。「低級アルキル基」としては、前記アルキル基のうち、炭素原子数1~6の直鎖状、分枝鎖状又は環状のアルキル基を挙げることができる。「アリール基」とは、単環式または多環式であり、さらに環上に1個以上の種々の置換基を有していてもよい芳香族炭化水素基をいい、例えば、フェニル、メチルフェニル、ジメチルフェニル、メトキシフェニル、ジメトキシフェニル、ニトロフェニル、ジニトロフェニル、クロロフェニル、ジクロロフェニル、プロモフェニル、ジプロモフェニル、ヨードフェニル、フルオロフェニル、トリフルオロメチルフェニル、アミノフェニル、ヒドロキシフェニル、メルカプトフェニル、-ナフチル、-ナフチル基等を挙げることができる。「ハロゲン原子」としては、塩素、臭素、ヨウ素、フッ素等を挙げることができる。

【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)で表される置換アニリンと一般式(III)で表される酸塩化物とを塩基の存在下、反応させることにより製造する工程である。

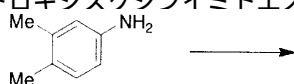
【0009】前記一般式(II)で表される置換アニリンとしては、たとえば、ジメチルアニリン、ジエチルアニリン、エチルメチルアニリン等を挙げることができる。また、一般式(III)で表される酸塩化物としては、たとえば、4-クロロホルミルブタン酸エチル、4-クロロホルミルブタン酸メチル、4-クロロホルミルブタン酸t-ブチル、5-クロロホルミルペンタン酸エチル、5-クロロホルミルペンタン酸メチル、5-クロロホルミルペンタン酸t-ブチル、6-クロロホルミルヘキサン酸エチル、6-クロロホルミルヘキサン酸メチル、6-クロロホルミルヘキサン酸t-ブチルなどを使用することができる。

【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(I)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塩素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塩素化合物を認識する抗体と、検体中の有機塩素化合物と、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、固相結合抗原を用いる方法と固相結合抗体を用いる方法との2通りがある。すなわち、固相に結合した該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10 応答を測定したり、固相結合抗体と標識された該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(標識された該カルボン酸)量に基づく応答を測定する等の方法を意味する。

【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を適宜用いることができる。結合方法としては、例えば、10 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、ヒドロキシスクシンイミドエステル、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、30 反応性や操作性の面からヒドロキシスクシンイミドエス*



【0018】アルゴン気流下、3,4-ジメチルアニリン500mg(4.12mmol)の無水ジクロロメタン溶液(10ml)にジイソプロピルエチルアミン1.07ml(6.18mmol)を加え、さらに氷冷下4-クロロホルミルブタン酸エチル0.72ml(4.53mmol)を加えて室温で2時間撹拌した。反応終了40 後、飽和塩化アンモニウム水溶液に投じ酢酸エチルで抽出した。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(ヘキサン-酢酸エチル=2:1)で精製し、さらにヘキサンとエーテルから再結晶することにより、4-(3,4-ジメチルフェニルカルバモイル)ブタン酸エチル792mg(収率72.9%)を得た。

【0019】mp. 50.5~51.0

¹H-NMR(400MHz, CDCl₃): 1.27(t, J=7.1Hz, 3H), 2.05(quin t 50

*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、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、有機塩素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塩素化合物は、PCB、ダイオキシン類等である。

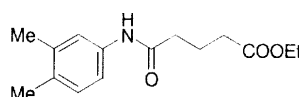
【0015】

【実施例】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 4-(3,4-ジメチルフェニルカルバモイル)ブタン酸エチルの合成

【0017】

【化12】



et, J=7.1Hz, 2H), 2.21(s, 3H), 2.24(s, 3H), 2.38~2.46(m, 4H), 4.15(q, J=7.1Hz, 2H), 7.06(d, J=8.2Hz, 1H), 7.21(d with fine coupling, J=8.2Hz, 1H), 7.24~7.28(m, 1H), 7.31(s with fine coupling, 1H) ppm.

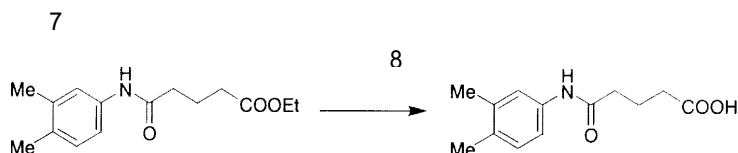
IR(KBr): 3376, 2972, 1716, 1694, 1596, 1532, 1402, 1312, 1180, 1020 cm⁻¹

Mass(m/z, %): 263(M⁺, 40), 218(21), 121(100).

【0020】参考例2 4-(3,4-ジメチルフェニルカルバモイル)ブタン酸の合成

【0021】

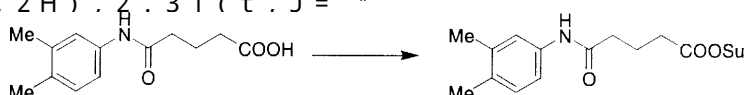
【化13】



【0022】4-(3,4-ジメチルフェニルカルバモイル)ブタン酸エチル584mg(2.22mmol)のエタノール溶液(10ml)に、4N水酸化リチウム水溶液1.0ml加え、室温で16時間攪拌した。反応終了後、反応溶媒を減圧下留去し、10%クエン酸水溶液を加えて析出した結晶を濾取した。減圧下乾燥後メタノールとエーテルとヘキサンから再結晶することにより4-(3,4-ジメチルフェニルカルバモイル)ブタン酸414mg(収率79.3%)を得た。

【0023】mp: 154.0~154.5

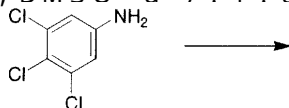
¹H-NMR(400MHz, DMSO-d₆): 1.78 (quintet, J=7.3Hz, 2H), 2.15 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.26 (t, J=7.3Hz, 2H), 2.31 (t, J=



【0026】4-(3,4-ジメチルフェニルカルバモイル)ブタン酸150mg(0.64mmol)の無水ジクロロメタン(10ml)と無水テトラヒドロフラン(2ml)の混合溶媒に、N-ヒドロキシスクシンイミド74mg(0.65mmol)、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125mg(0.65mmol)を加え、室温で20時間50分攪拌した。反応終了後、反応溶媒を減圧下留去しシリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム-メタノール=20:1)で精製し、さらにヘキサンとエーテルから再結晶することにより、N-スクシンイミジル-4-(3,4-ジメチルフェニルカルバモイル)ブタン酸エチル170mg(収率80.2%)を得た。

【0027】mp: 150.0~151.0

¹H-NMR(400MHz, DMSO-d₆): 1.8*



【0030】アルゴン気流下、3,4,5-トリクロロアニリン308mg(1.57mmol)の無水ジクロロメタン溶液(15ml)に4-クロロホルミルブタン酸エチル308mg(1.72mmol)、4-ジメチルアミノピリジン211mg(1.72mmol)を加え、室温で16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

*7.3Hz, 2H), 7.02 (d, J=8.1Hz, 1H), 7.29 (d, J=8.1Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 9.71 (s, 1H) ppm.

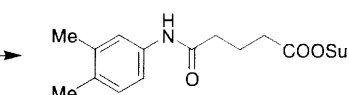
IR (KBr): 3296, 3032, 2948, 1698, 1660, 1538, 1308, 1196 cm⁻¹

Mass (m/z, %): 235 (M⁺, 69), 121 (100).

【0024】参考例3 N-スクシンイミジル-4-(3,4-ジメチルフェニルカルバモイル)ブタン酸エチルの合成

【0025】

【化14】



*6~1.95 (m, 2H), 2.15 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.41 (t, J=7.4Hz, 2H), 2.75 (t, J=7.4Hz, 2H), 2.82 (s, 4H), 7.02 (d, J=7.9Hz, 1H), 7.28 (d, J=7.9Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 9.76 (s, 1H) ppm.

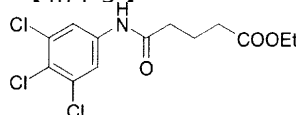
IR (KBr): 3292, 2952, 1814, 1780, 1740, 1658, 1538, 1366, 1208, 1066 cm⁻¹

Mass (m/z, %): 332 (M⁺, 71), 218 (81), 121 (100).

【0028】参考例4 4-(3,4,5-トリクロロフェニルカルバモイル)ブタン酸エチルの合成

【0029】

【化15】



-酢酸エチル=5:1)で精製し、エーテル-ヘキサンから再結晶することにより、4-(3,4,5-トリクロロフェニルカルバモイル)ブタン酸エチル418mg(収率78.7%)を得た。

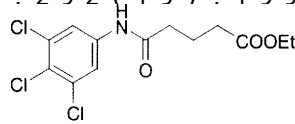
【0031】mp: 88.5~89.5

¹H-NMR(400MHz, CDCl₃): 1.28 (t, J=7.1Hz, 3H), 2.00~2.07 (m, 2H), 2.44 (t, J=7.1, 4H), 4.16 (q, J=7.1Hz, 2H), 7.67 (s, 2H), 7.74 (bs, 1H) ppm.

9

IR (KBr) : 3300, 1730, 1668, 1588, 1520, 1444, 1378, 1150, 860 cm^{-1}

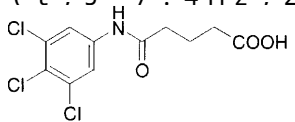
Mass (m/z, %) : 341 ($\text{M}^+ + 4$, 6), 339 ($\text{M}^+ + 2$, 18), 337 (M^+ , 19), 296 (6), 294 (18), 292 (19), 199 *



【0034】4-(3,4,5-トリクロロフェニルカルバモイル)ブタン酸エチル803mg(2.37mmol)をエタノール100mlに溶解し、5N水酸化ナトリウム水溶液2mlを加え、20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。酢酸エチル-エーテル-ヘキサンから再結晶し、4-(3,4,5-トリクロロフェニルカルバモイル)ブタン酸552mg(収率75.0%)を得た。

【0035】mp. 185.0~186.0

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) : 1.75~1.84 (m, 2H), 2.28 (t, J=7.3Hz, 2H), 2.38 (t, J=7.4Hz, 2H) *



【0038】4-(3,4,5-トリクロロフェニルカルバモイル)ブタン酸311mg(1.00mmol)の無水ジクロロメタン溶液(20ml)に、N-ヒドロキススクシンイミド127mg(1.10mmol)、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211mg(1.10mmol)を加え、室温で21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-(ヘキサン-酢酸エチル=1:1)で精製し、酢酸エチル-エーテル-ヘキサンから再結晶することにより、N-スクシンイミジル-4-(3,4,5-トリクロロフェニルカルバモイル)ブタネート337mg(収率82.8%)を得た。

【0039】mp. 154.0~155.0

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) : 2.17~2.25 (m, 2H), 2.47 (t, J=7.0Hz, 2H), 2.72 (t, J=6.6Hz, 2H), 2.93 (bs, 4H), 7.68 (s, 2H), 8.21 (bs, 1H) ppm.

IR (KBr) : 3372, 1738, 1706, 1550

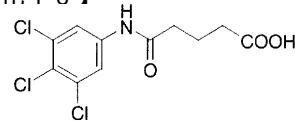
10

* (9), 197 (27), 195 (30), 143 (100) 155 (38).

【0032】参考例5 4-(3,4,5-トリクロロフェニルカルバモイル)ブタン酸の合成

【0033】

【化16】



*H), 7.86 (s, 2H), 10.33 (bs, 1H) ppm.

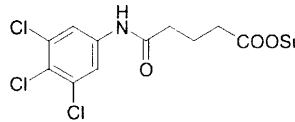
IR (KBr) : 3316, 1718, 1672, 1586, 1532, 1442, 1196 cm^{-1}

Mass (m/z, %) : 313 ($\text{M}^+ + 4$, 7), 311 ($\text{M}^+ + 2$, 22), 309 (M^+ , 22), 199 (31), 197 (92), 195 (100), 115 (33).

【0036】参考例6 N-スクシンイミジル-4-(3,4,5-トリクロロフェニルカルバモイル)ブタネートの合成

【0037】

【化17】



84, 1520, 1442, 1222, 1064 cm^{-1}
Mass (m/z, %) : 410 ($\text{M}^+ + 4$, 0.1), 408 ($\text{M}^+ + 2$, 0.5), (406 (M^+ , 0.6), 295 (20), 293 (65), 291 (67), 267 (30), 265 (95), 263 (100), 199 (10), 197 (31), 195 (35).

【0040】参考例7 4-(3,4,5-トリクロロフェニルカルバモイル)ブタン酸結合BSAの合成
ウシ血清アルブミン(BSA)5.0mgを0.1Mのリン酸緩衝液(pH7.5)900 μl に溶解し、N-スクシンイミジル-4-(3,4,5-トリクロロフェニルカルバモイル)ブタネート1.0mgの無水ジメチルホルムアミド溶液100 μl を加え、室温で5時間撹拌した。その後反応液をPBS中で透析し脱塩して、標記4-(3,4,5-トリクロロフェニルカルバモイル)ブタン酸結合BSAを得た。

【0041】参考例8 4-(3,4,5-トリクロロフェニルカルバモイル)ブタン酸結合BSA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、50~400µg/mlに調整した参考例7で作成した4-(3,4,5-トリクロロフェニルカルバモイル)ブタン酸結合BSA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、80mg/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4-(3,4,5-トリクロロフェニルカルバモイル)ブタン酸結合BSA感作粒子を得た。

【0042】参考例9 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。

【0043】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Delay 1ステップ競合法にて行った。PCB#169の標準抗原液 130µlとALP標識抗PCB#169抗体液 10µlとを37 10分間免疫反応し、次いで、その反応混合液 120µlと参考例8で作成した4-(3,4,5-トリクロロフェニルカルバモイル)ブタン酸結合BSA感作粒子 150µlとを、3 *30

*7 10分間免疫反応させた。洗浄後、基質(AMP PD)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。

【0044】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、0~5ng/mlの濃度に調整したものをを用いた。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。また、標準曲線から推定したB/B0=90%, 85%, 50%の値を表1に示す。

【0045】

【表1】

B/B0	ng/ml
90%	0.09
85%	0.12
50%	0.52

【0046】また、4-(3,4,5-トリクロロフェニルカルバモイル)ブタン酸結合BSA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;TEF 0.1以上)ダイオキシン11種との交叉反応性の測定結果を表2および表3に示す。その結果、PCB#169測定系では、PCB及びダイオキシンの同族体と多数交叉反応性を示した。

【0047】

【表2】

PCB	4-(3,4,5-トリクロロフェニルカルバモイル)ブタン酸結合BSA	
	PCB#169測定系	
3,3',4,4'-TCB(77)		3.2
3,4,4',5'-TCB(81)		1.9
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)		21.0
2,3,3',4,4',5'-HxCB(156)		-
2,3,3',4,4',5'-HxCB(157)		-
2,3',4,4',5,5'-HxCB(167)		-
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 %)

【0048】

【表3】

14
PCB#169測定系に対するDioxinの交叉反応性*

Dioxin	4-(3,4,5-トリクロロフェニルカルボモル)ブチ 酸結合BSA	
	PCB#169測定系	
2,3,7,8-TCDD		-
1,2,3,7,8-PeCDD		19.0
1,2,3,4,7,8-HeCDD		-
1,2,3,6,7,8-HeCDD		28.7
1,2,3,7,8,9-HeCDD		-
2,3,7,8-TCDF		-
2,3,4,7,8-PeCDF		41.3
1,2,3,4,7,8-HeCDF		-
1,2,3,6,7,8-HeCDF		5.3
1,2,3,7,8,9-HeCDF		-
2,3,4,6,7,8-HeCDF		17.7

*50%阻害率の濃度の割合から求めた(単位 %)。

【0049】

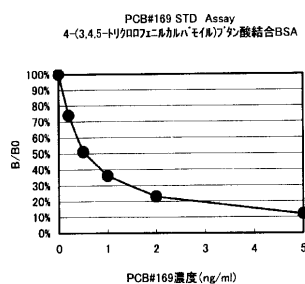
【発明の効果】本発明は、前記一般式(I)で表されるカルボン酸を用いる有機塩素化合物の測定方法であり、PCBやダイオキシン類などの有機塩素化合物を酵素免疫測定方法で測定することができる。さらに本発明によ

り、広汎な有機塩素化合物を簡便に測定することができる。

【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】



专利名称(译)	有机氯化物的免疫测定方法		
公开(公告)号	JP2002277466A	公开(公告)日	2002-09-25
申请号	JP2001073965	申请日	2001-03-15
[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 G01N33/531		
FI分类号	G01N33/53.S G01N33/531.A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种通过酶免疫法测定广泛的有机氯化物（如PCB和二恶英）的方法，该方法取代了传统的复杂测量方法。解决方案：通用公式（式中，A为二烷基取代的苯基或三卤素取代的苯基，m为3~5的整数。）由固相结合抗原或标记抗原表示的羧酸。结果，可以通过免疫测定方法来测量有机氯化物。

