

(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 - 277467

(P2002 - 277467A)

(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 14 O L (全 9 数)

(21)出願番号 特願2001 - 74002(P2001 - 74002)

(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)

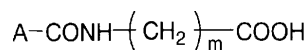
(54)【発明の名称】 有機塩素化合物の免疫測定法

(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

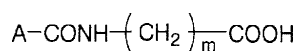
【化 1】



(式中、Aは置換芳香族炭化水素基または置換複素環基であり、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。

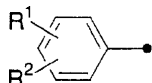
1

【特許請求の範囲】
【請求項1】 一般式
【化1】



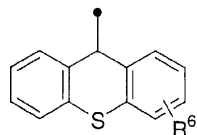
で表されるカルボン酸を、固相结合抗原または標識抗原の抗原として用いる有機塩素化合物の免疫測定方法（式中、Aは

【化2】



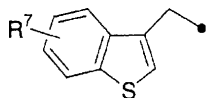
で表される置換フェニル基（式中、R¹およびR²は低級アルキル基である。）

【化3】



で表される基（式中、R⁶はハロゲン原子である。）

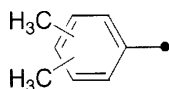
【化6】



で表される基（式中、R⁷はハロゲン原子である。）または3,4-メチレンジオキシフェニル基であり、mは3ないし5の整数である。）

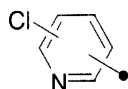
【請求項2】 mが5である請求項1に記載の免疫測定方法。

【請求項3】 Aが
【化7】



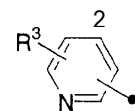
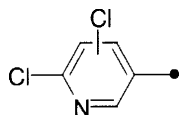
で表される基である請求項1または2に記載の免疫測定方法。

【請求項4】 Aが
【化8】



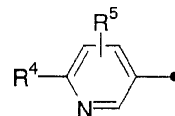
で表される基である請求項1または2に記載の免疫測定方法。

【請求項5】 Aが、
【化9】



*で表される置換ピリジル基（式中、R³はハロゲン原子である。）

【化4】

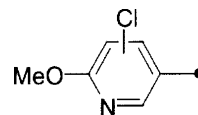


で表される置換ピリジル基（式中、R⁴はハロゲン原子またはアルコキシル基、R⁵はハロゲン原子である。）

【化5】

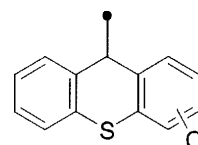
で表される基である請求項1または2に記載の免疫測定方法。

【請求項6】 Aが、
【化10】



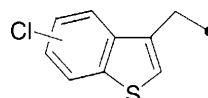
で表される基である請求項1または2に記載の免疫測定方法。

【請求項7】 Aが
【化11】



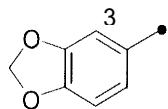
で表される基である請求項1または2に記載の免疫測定方法。

40 【請求項8】 Aが
【化12】



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9】 Aが
【化13】



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 10】 固相に結合された請求項 1 ないし 9 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 11】 請求項 1 ないし 9 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 10 記載の免疫測定方法。

【請求項 12】 標識された請求項 1 ないし 9 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。

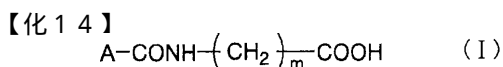
【請求項 13】 有機塩素化合物が、PCB およびダイオキシン類からなる群から選択される 1 種または 2 種以上の化合物である請求項 1 ないし 12 のいずれかに記載の免疫測定方法。

【請求項 14】 請求項 1 ないし 13 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】

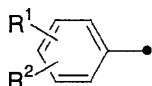
【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、一般式



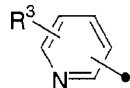
(式中、A は

【化 15】



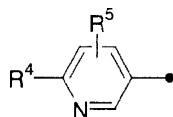
で表される置換フェニル基(式中、R¹およびR²は低級アルキル基である。)、

【化 16】

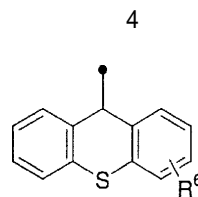


で表される置換ピリジル基(式中、R³はハロゲン原子である。)、

【化 17】



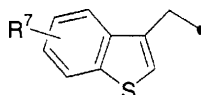
で表される置換ピリジル基(式中、R⁴はハロゲン原子またはアルコキシル基、R⁵はハロゲン原子である。)、



【化 18】

で表される基(式中、R⁶はハロゲン原子である。)

【化 19】



で表される基(式中、R⁷はハロゲン原子である。)または 3, 4 - メチレンジオキシフェニル基であり、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さいの固相結合抗原の抗原、または標識抗原の抗原として使用することができる。

【0002】

20 【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】

30 【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

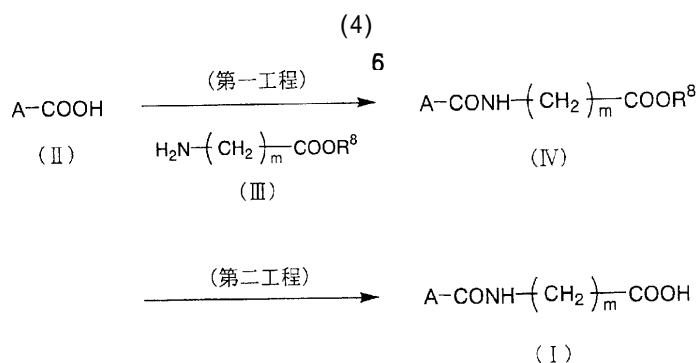
40 成した。

【0005】

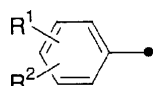
【発明の実施の形態】本発明の前記一般式(I)で表されるカルボン酸は、以下の式に従い製造することができる。

【0006】

【化 20】

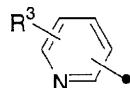


【0007】(式中、Aは
【化21】



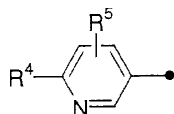
で表される置換フェニル基(式中、R¹およびR²は低級アルキル基である。)、

【化22】



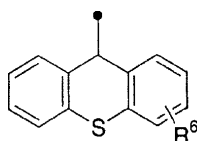
で表される置換ピリジル基(式中、R³はハロゲン原子である。)、

【化23】



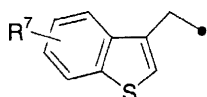
で表される置換ピリジル基(式中、R⁴はハロゲン原子またはアルコキシ基、R⁵はハロゲン原子である。)、

【化24】



で表される基(式中、R⁶はハロゲン原子である。)

【化25】



で表される基(式中、R⁷はハロゲン原子である。)または3,4-メチレンジオキシフェニル基であり、R⁸はアルキル基またはアリール基であり、mは3ないし5の整数である。)

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もできる。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もできる。「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もできる。「アルコキシ基」とは、前記「低級アルキル基」に酸素原子が結合した基であり、例えばメトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、1-メチルエチルオキシ基、n-ブトキシ基、2-メチルプロピルオキシ基、1-メチルプロピルオキシ基、2-メチル-2-プロピルオキシ基、2,2-ジメチルエチルオキシ基、n-ペンチルオキシ基、3-メチルブチルオキシ基、n-ヘキシルオキシ基、4-メチルペンチルオキシ基、シクロヘキシルオキシ基等を挙げることもできる。「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もできる。「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、カルボン酸誘導体(II)とアミン化合物(III)とを、縮合剤存在下、脱水縮合させることによりエステル誘導体(IV)を製造する工程である。また、該エステル誘導体(IV)は、カルボン酸誘導体(II)を他の酸成分と反応させて混合酸無水物にした後、アミン化合物(III)と反応させることによっても製造することができる。

【0009】前記一般式(II)で表されるカルボン酸誘導体としては、たとえば、ジメチル安息香酸、ジエチル安息香酸、エチルメチル安息香酸、3,4-ジメトキシ安息香酸、3,4-ジエトキシ安息香酸、3,4-メチレンジオキシ安息香酸、2-クロロニコチン酸、4-クロロニコチン酸、5-クロロニコチン酸、6-クロロニコチン酸、2-フルオロニコチン酸、4-フルオロニコチン酸、5-フルオロニコチン酸、6-フルオロニコチン酸、2-ブロモニコチン酸、4-ブロモニコチン酸、5-ブロモニコチン酸、6-ブロモニコチン酸、2-クロロイソニコチン酸、3-クロロイソニコチン酸、5-クロロイソニコチン酸、6-クロロイソニコチン酸、2-フルオロイソニコチン酸、3-フルオロイソニコチン酸、5-フルオロイソニコチン酸、6-フルオロイソニコチン酸、2-プロモイソニコチン酸、3-プロモイソニコチン酸、5-プロモイソニコチン酸、6-プロモイソニコチン酸、2,6-ジクロロニコチン酸、4,6-ジクロロニコチン酸、5,6-ジクロロニコチン酸、2,6-ジフルオロニコチン酸、4,6-ジフルオロニコチン酸、5,6-ジフルオロニコチン酸、2,6-ジプロモニコチン酸、4,6-ジプロモニコチン酸、5,6-ジプロモニコチン酸、2-クロロ-6-メトキシニコチン酸、4-クロロ-6-メトキシニコチン酸、5-クロロ-6-メトキシニコチン酸、2-プロモ-6-メトキシニコチン酸、4-プロモ-6-メトキシニコチン酸、5-プロモ-6-メトキシニコチン酸、2-フルオロ-6-メトキシニコチン酸、4-フルオロ-6-メトキシニコチン酸、5-フルオロ-6-メトキシニコチン酸、2-クロロ-6-エトキシニコチン酸、4-クロロ-6-エトキシニコチン酸、5-クロロ-6-エトキシニコチン酸、2-プロモ-6-エトキシニコチン酸、4-プロモ-6-エトキシニコチン酸、5-プロモ-6-エトキシニコチン酸、2-フルオロ-6-エトキシニコチン酸、4-フルオロ-6-エトキシニコチン酸、5-フルオロ-6-エトキシニコチン酸、1-クロロチオキサンテン-9-カルボン酸、2-クロロチオキサンテン-9-カルボン酸、3-クロロチオキサンテン-9-カルボン酸、4-クロロチオキサンテン-9-カルボン酸、5-クロロチオキサンテン-9-カルボン酸、6-クロロチオキサンテン-9-カルボン酸、7-クロロチオキサンテン-9-カルボン酸、8-クロロチオキサン

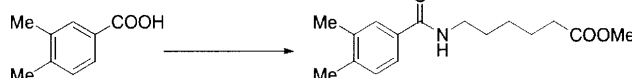
テン-9-カルボン酸、2-フルオロチオキサンテン-9-カルボン酸、3-フルオロチオキサンテン-9-カルボン酸、4-フルオロチオキサンテン-9-カルボン酸、5-フルオロチオキサンテン-9-カルボン酸、6-フルオロチオキサンテン-9-カルボン酸、7-フルオロチオキサンテン-9-カルボン酸、8-フルオロチオキサンテン-9-カルボン酸、2-プロモチオキサンテン-9-カルボン酸、3-プロモチオキサンテン-9-カルボン酸、4-プロモチオキサンテン-9-カルボン酸、5-プロモチオキサンテン-9-カルボン酸、6-プロモチオキサンテン-9-カルボン酸、7-プロモチオキサンテン-9-カルボン酸、8-プロモチオキサンテン-9-カルボン酸、2-クロロベンゾチオフェン-3-酢酸、4-クロロベンゾチオフェン-3-酢酸、5-クロロベンゾチオフェン-3-酢酸、6-クロロベンゾチオフェン-3-酢酸、7-クロロベンゾチオフェン-3-酢酸、2-フルオロベンゾチオフェン-3-酢酸、4-フルオロベンゾチオフェン-3-酢酸、5-フルオロベンゾチオフェン-3-酢酸、6-フルオロベンゾチオフェン-3-酢酸、7-フルオロベンゾチオフェン-3-酢酸、2-プロモベンゾチオフェン-3-酢酸、4-プロモベンゾチオフェン-3-酢酸、5-プロモベンゾチオフェン-3-酢酸、6-プロモベンゾチオフェン-3-酢酸、7-プロモベンゾチオフェン-3-酢酸等を挙げることができる。また、前記一般式(II)で表されるアミン化合物としては、たとえば、6-アミノヘキサン酸メチル、6-アミノヘキサン酸エチル、6-アミノヘキサン酸t-ブチル、5-アミノペンタン酸メチル、5-アミノペンタン酸エチル、5-アミノペンタン酸t-ブチル、4-アミノブタン酸メチル、4-アミノブタン酸エチル、4-アミノブタン酸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(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応答を測定したり、固相结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。

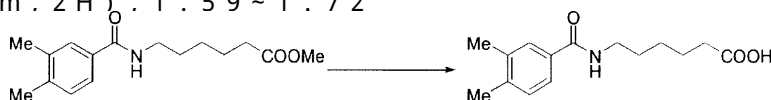
【0012】前記一般式(I)で表されるカルボン酸

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、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-ジカルボキシイミドエステル等の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、反応性や操作性の面からヒドロキスクシンイ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-C*



【0018】アルゴンガス雰囲気下、3,4-ジメチル安息香酸500mg (3.33mmol)の無水ジクロロメタン(10ml)溶液に、6-アミノヘキサン酸メチル塩酸塩605mg (3.33mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール612mg (4.00mmol)、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766mg (4.00mmol)とトリエチルアミン0.6ml (4.3mmol)を加え、室温で3.5日攪拌した。反応終了後、反応溶液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液に投じ、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、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)で精製することにより、6-(3,4-ジメチルベンゾイルアミノ)ヘキサン酸メチル845mg (収率91.5%)を得た。

【0019】NMR (400MHz, CDCl₃): 1.37~1.47 (m, 2H), 1.59~1.72*



【0022】アルゴンガス雰囲気下、6-(3,4-ジメチルベンゾイルアミノ)ヘキサン酸メチル684mg (2.47mmol)のメタノール溶液(10ml)に

*arboonyldiimidazole)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、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 6-(3,4-ジメチルベンゾイルアミノ)ヘキサン酸メチルの合成

【0017】

【化26】

* (m, 4H), 2.28 (s, 3H), 2.30 (s, 3H), 2.34 (t, J=7.3Hz, 2H), 3.42~3.49 (m, 2H), 3.67 (s, 3H), 6.06~6.20 (m, 1H), 7.18 (d, J=7.9Hz, 1H), 7.47 (d with fine coupling, J=7.9Hz, 1H), 7.55 (s with fine coupling, 1H) ppm.

IR (liquid film): 3344, 2944, 1740, 1640, 1546, 1316, 1274 cm⁻¹

Mass (m/z, %): 277 (M⁺, 65), 204 (40), 133 (100), 105 (50).

【0020】参考例2 6-(3,4-ジメチルベンゾイルアミノ)ヘキサン酸の合成

【0021】

【化27】

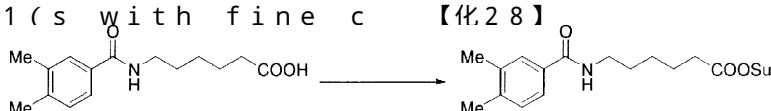
4N水酸化リチウム水溶液1.5mlを加え、室温で15時間30分攪拌した。反応終了後、反応溶媒を減圧下留去し、残留物に10%クエン酸水溶液を加え、析出し

11

た結晶を濾取し、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、6-(3,4-ジメチル
ベンゾイルアミノ)ヘキサン酸502mg(収率77.
3%)を得た。

【0023】mp:108.0~108.5

NMR(400MHz, DMSO-d₆):1.25~
1.34(m, 2H), 1.46~1.57(m, 4
H), 2.20(t, J=7.4Hz, 2H), 2.2
5(s, 6H), 3.18~3.24(m, 2H),
7.19(d, J=7.9Hz, 1H), 7.55(d
with fine coupling, J=7.9
Hz, 1H), 7.61(s with fine c



【0026】6-(3,4-ジメチルベンゾイルアミ
ノ)ヘキサン酸150mg(0.57mmol)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-ヒドロキシスクシイミ
ド68mg(0.59mmol)、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11
3mg(0.59mmol)を加えて室温で12時間2
0分攪拌し、さらにN-ヒドロキシスクシイミド7m
g(0.06mmol)、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10mg
(0.05mmol)を加え、室温で6時間攪拌した。
反応終了後、反応溶媒を減圧下留去し、残留物をシリカ
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、さらにヘキサンとジクロロメタン
から再結晶することにより、N-スクシイミジル-6-
-(3,4-ジメチルベンゾイルアミノ)ヘキサノエー
ト147mg(収率71.6%)を得た。

【0027】mp:102.0~103.0

NMR(400MHz, DMSO-d₆):1.36~
1.44(m, 2H), 1.49~1.58(m, 2
H), 1.60~1.70(m, 2H), 2.25
(s, 6H), 2.67(t, J=7.3Hz, 2
H), 2.81(s, 4H), 3.19~3.28
(m, 2H), 7.20(d, J=8.1Hz, 1
H), 7.55(d with fine coupl
ing, J=8.1Hz, 1H), 7.62(s wi
th fine coupling, 1H), 8.26
~8.34(m, 1H)ppm.

IR(KBr):3372, 2944, 1832, 17
90, 1730, 1642, 1532, 1210, 10
72cm⁻¹

Mass(m/z, %):360(M⁺, 12), 13
3(100), 105(17).

【0028】参考例4 6-(3,4-ジメチルベンゾ
イルアミノ)ヘキサン酸結合BSAの合成

12

coupling, 1H), 8.24~8.34(m, 1
H)ppm.

IR(KBr):3380, 3144, 2956, 17
48, 1630, 1540, 1500, 1314, 12
82cm⁻¹

Mass(m/z, %):263(M⁺, 19), 13
3(100), 105(18).

【0024】参考例3 N-スクシイミジル-6-
(3,4-ジメチルベンゾイルアミノ)ヘキサノエー
トの合成

【0025】

【化28】

ウシ血清アルブミン(BSA)5.0mgを0.1M
のリン酸緩衝液(pH7.5)900μlに溶解し、N
-スクシイミジル-6-(3,4-ジメチルベンゾ
イルアミノ)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6-(3,4-ジメチルベンゾイルアミノ)ヘキ
サン酸結合BSAを得た。

【0029】参考例5 6-(3,4-ジメチルベンゾ
イルアミノ)ヘキサン酸結合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4で作成した6-(3,4-ジメチルベンゾ
イルアミノ)ヘキサン酸結合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)1m
l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6-(3,4-ジメチルベンゾ
イルアミノ)ヘキサン酸結合BSA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'-ペンタクロロビフェニル)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AL
P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De

lay 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5で作成した6-(3,4-ジメチルベンゾイルアミノ)ヘキサン酸結合BSA感作粒子150μlとを、37 10分間免疫反応をさせた。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(ジーエルサイエンス社製)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。

【0033】

*【表1】

B/B0	ng/ml
90%	0.12
85%	0.16
50%	0.66

【0034】また、6-(3,4-ジメチルベンゾイルアミノ)ヘキサン酸結合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。

【0035】

【表2】

*
PCB同族体の交叉反応性*

PCB	6-(3,4-ジメチルベンゾイルアミノ)ヘキサン酸結合BSA	
	PCB#169測定系	
3,3',4,4'-TCB(77)		3.0
3,4,4',5'-TCB(81)		2.0
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)		24.4
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 %)。

【0036】

【表3】

*
PCB#169測定系に対するDioxinの交叉反応性*

Dioxin	6-(3,4-ジメチルベンゾイルアミノ)ヘキサン酸結合BSA	
	PCB#169測定系	
2,3,7,8-TCDD		-
1,2,3,7,8-PeCDD		18.7
1,2,3,4,7,8-HeCDD		-
1,2,3,6,7,8-HeCDD		31.4
1,2,3,7,8,9-HeCDD		-
2,3,7,8-TCDF		-
2,3,4,7,8-PeCDF		39.8
1,2,3,4,7,8-HeCDF		-
1,2,3,6,7,8-HeCDF		5.8
1,2,3,7,8,9-HeCDF		-
2,3,4,6,7,8-HeCDF		15.2

*50%阻害率の濃度の割合から求めた(単位 %)。

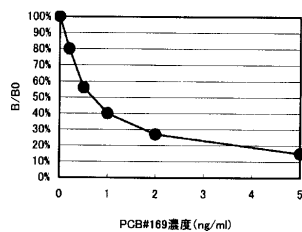
【発明の効果】本発明は、前記一般式(I)で表されるカルボン酸を用いる有機塩素化合物の測定方法であり、PCBやダイオキシン類などの有機塩素化合物を酵素免疫測定方法で測定することができる。さらに本発明により、広汎な有機塩素化合物を簡便に測定することができ

【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#189 STD Assay
6-(3,4-ジメチルヘイブチルアミノ)ヘキサン酸結合BSA



专利名称(译)	有机氯化物的免疫测定		
公开(公告)号	JP2002277467A	公开(公告)日	2002-09-25
申请号	JP2001074002	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量多种有机氯化物（如PCB和二恶英）的方法，该方法代替了传统的复杂测量方法。解决方案：通用公式（式中，A为取代的芳香族烃基或取代的杂环基，m为3~5的整数。）羧酸作为固相结合抗原或标记抗原的抗原的用途。因此，有机氯化物可以通过免疫测定法进行测定。

