

(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 - 145870

(P2002 - 145870A)

(43)公開日 平成14年5月22日(2002.5.22)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 D251/52			C 0 7 D251/52	E
G 0 1 N 33/15			G 0 1 N 33/15	C
		33/53	33/53	G
		33/566	33/566	
		33/577	33/577	B

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 11数)

(21)出願番号 特願2000 - 341294(P2000 - 341294)

(22)出願日 平成12年11月9日(2000.11.9)

(71)出願人 000206901

大塚化学株式会社

大阪府大阪市中央区大手通3丁目2番27号

(72)発明者 大川 秀郎

兵庫県神戸市北区柏尾台14 - 14

(72)発明者 中田 昌伸

大阪府豊中市東寺内町17 - 7 - 406

(72)発明者 石内 雅丈

兵庫県神戸市灘区伯母野山町3 - 1 - 25 高木ハイツ105

(74)代理人 100065215

弁理士 三枝 英二 (外 8 名)

最終頁に続く

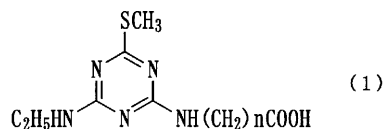
(54)【発明の名称】 シメトリン化合物、免疫学的反応体、ハイブリドーマ及びシメトリンの測定方法

(57)【要約】

【課題】 本発明は、土壌や水田排水溝、河川等の環境水中等におけるシメトリンの濃度の簡便、迅速な測定法に好適に使用され得る新規シメトリン化合物を提供することを課題とする。

【解決手段】 本発明のシメトリン化合物は、一般式

【化 1】

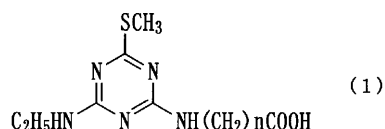


[式中、nは1～9の整数を示す。]で表される。また、本発明によれば、シメトリン化合物と担体又は標識物質との結合体、シメトリン等に反応性を有する免疫学的反応体等が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式(1)

【化1】



[式中、nは1～9の整数を示す。]で表されるシメトリン化合物。

【請求項2】 請求項1に記載のシメトリン化合物と担体又は標識物質との結合体。

【請求項3】 シメトリン及び請求項1に記載のシメトリン化合物に反応性を示す免疫学的反応体。

【請求項4】 免疫学的反応体がモノクローナル抗体である請求項3に記載の免疫学的反応体。

【請求項5】 請求項3に記載の免疫学的反応体を産生するハイブリドーマ。

【請求項6】 請求項3又は請求項4に記載の免疫学的反応体を用いることを特徴とするシメトリンの免疫学的測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

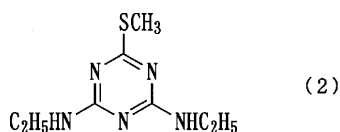
【発明の属する技術分野】本発明は、シメトリン化合物、免疫学的反応体、ハイブリドーマ及びシメトリンの測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】トリアジン系除草剤である「シメトリン」、すなわち2,4-ジ(エチルアミノ)-6-メチルチオ-1,3,5-トリアジンは、式(2)

【0003】

【化2】



【0004】で表される構造を有する化合物である。

【0005】シメトリンは、水田除草剤として広く用いられていることから、その周辺の河川や土壌への汚染が予想され、そのモニタリングが重要な課題となっている。殊に、この製剤は田植時に集中して散布されるので、水田から流亡して水田排水溝や河川におけるシメトリンの濃度が高くなるのを避け得ない。従って、この時期において水中濃度をモニタリングすることは特に重要である。

【0006】従来、これら除草剤の分析には、機器分析法が用いられ、例えば、水中濃度のモニタリングの場合には、試料から農薬を抽出・精製した後に、ガスクロマトグラフィーを用いた測定が行われてきた。これらの方法は、精度の点では問題はないものの、操作が煩雑で測定に時間がかかるため、環境中や食物中に残留するシメ

トリンを、より迅速、簡便かつ経済的にモニタリングすることのできる、新しい測定法の開発が求められていた。

【0007】一方、免疫学的測定法は、抗原抗体反応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、迅速、簡便かつ経済的な測定法である。従来、免疫学的測定法は、臨床診断の分野で患者の病態の解析法の一つとして、大きな役割を担ってきたが、環境中に残留する農薬等の物質の測定にも、次第に適用されるようになってきた。しかし、シメトリンへの適用は、その必要性が高かったのにも拘わらず、従来は全く行われておらず、適当な抗体はもとより、抗体を調製するためのハプテンも得られていなかった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】農薬は農作物の栽培を容易にし、安定した生産性を確保し、しかも、生産物の品質を確保するのに極めて重要な役割を果たしている。しかし、一般消費者にとって農薬の使用に伴う環境汚染、食品への残留、人体への影響は大きな関心事になっている。さらに、日本の食糧自給率は次第に下がり、多くを輸入に頼っているのが実情である。このような輸入農産物にもポストハーベスト農薬の使用による残留農薬に対する危惧が高まっている。環境や食品に関する安全性確保のためには、これらに含有される残留農薬の量を迅速、かつ正確に測定することが必要である。

【0009】従来、残留農薬の測定に当たっては、主に、試料から農薬を抽出し、精製後、ガスクロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーを用いて分析している。これらの方法は、その感度や精度の点で優れているものの、試料の調製が煩雑で多大の手間と時間を必要とし、分析に熟練を要すること、並びに、測定装置や設備費等に高額な費用を必要とする。環境や農産物に残留する農薬の分析では短時間の内に結果を出す必要があり、精度面以外にも簡便性、迅速性、かつ経済性を備えた新しい測定法が要望されている。

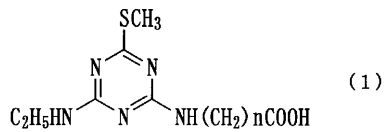
【0010】そこで、本発明者らは、土壌や水田排水溝、河川等の環境水中等におけるシメトリンの濃度の簡便、迅速な測定法として、シメトリンに対して反応性を有する抗体を用いる免疫化学的検出法の適用を検討してきた。その結果、下記一般式(1)で表されるシメトリン化合物を合成し、これをハプテンとして用いて得られるシメトリン化合物と担体との結合体が、シメトリンに反応する免疫学的反応体の調製に適していることを見出した。また、このようにして調製された免疫学的反応体、例えばモノクローナル抗体がシメトリンと特異的に反応し、これらの免疫学的反応体を用いる免疫学的測定法により、シメトリンを正確に測定することができることを見出した。本発明は、斯かる知見に基づき完成されたものである。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、一般式 (1)

【0012】

【化3】



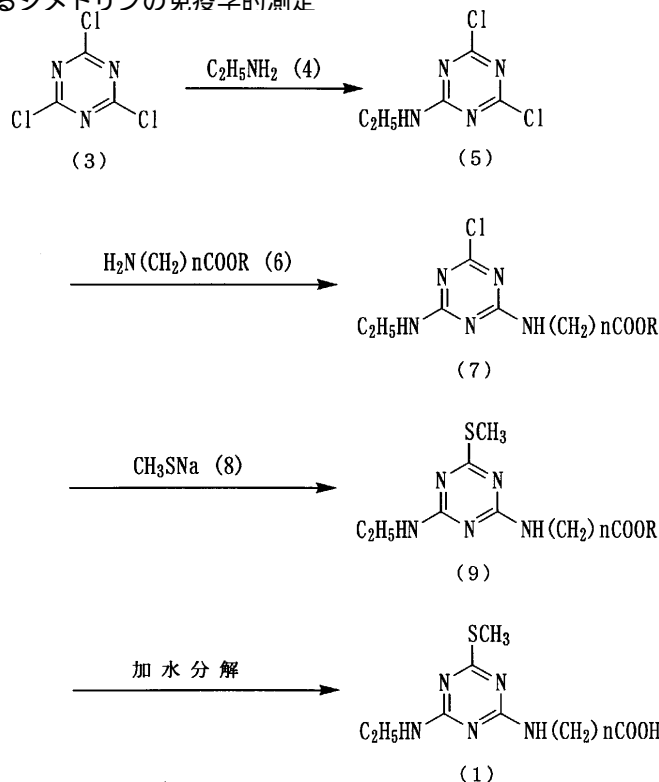
【0013】[式中、nは1~9の整数を示す。]で表されるシメトリン化合物が提供される。

【0014】また、本発明によれば、前記一般式(1)で表されるシメトリン化合物と担体又は標識物質との結合体が提供される。

【0015】また、本発明によれば、シメトリン及び前記一般式(1)で表されるシメトリン化合物に反応性を示す免疫学的反応体、例えばモノクローナル抗体が提供される。

【0016】また、本発明によれば、シメトリン及び前記一般式(1)で表されるシメトリン化合物に反応性を示す免疫学的反応体、例えばモノクローナル抗体を産生

【0017】また、本発明によれば、前記免疫学的反応体を用いることを特徴とするシメトリンの免疫学的測定*



【0023】[式中、Rはカルボキシル保護基を示す。nは前記に同じ。]

即ち、一般式(1)で表される本発明化合物は、式(3)で表される塩化シアヌル(2,4,6-トリクロロ-s-トリアジン)と式(4)で表されるエチルアミンとを反応させて、式(5)で表される2,4-ジクロ

*方法が提供される。

【0018】本発明方法によれば、シメトリン分析の大幅な簡略化と測定時間の短縮が可能となり、多数の検体を迅速、簡便かつ経済的に測定できるようになった。

【0019】

【発明の実施の形態】以下、本発明のシメトリン化合物及びその合成方法、シメトリン化合物と担体又は標識物質との結合体及びその調製方法、ポリクローナル抗体の調製方法、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの分離及びハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体の調製方法、これらの抗体フラグメントの調製方法、そして免疫学的分析測定の順に説明する。

【0020】本発明の一般式(1)で表されるシメトリン化合物は、文献未記載の新規化合物である。一般式(1)において、nは1~9の整数、好ましくは2~5の整数である。

【0021】一般式(1)で表される本発明化合物は、公知の方法に従って製造することができる。例えば、一般式(1)で表される本発明化合物は、下記反応式に示す方法に従い、製造される。

【0022】

【化4】

ロ-6-エチルアミノ-s-トリアジンに導き、次いでこの化合物(5)を一般式(6)で表されるアミノ酸化合物と反応させて、一般式(7)で表されるシメトリン化合物に導き、更にこの化合物(7)を式(8)で表されるメチルメルカプタンナトリウム塩と反応させて、一般式(9)で表される保護されたシメトリン化合物に導

き、最後にこの化合物(9)からカルボキシル保護基を除去することによって製造される。

【0024】前記一般式(6)において、カルボキシル保護基としては従来公知のものでよく、特に限定されるものではないが、例えばメチル基、エチル基、tert-ブチル基、ベンジル基、tert-ブチルジメチルシリル基、トリメチルシリル基等を例示できる。

【0025】式(3)で表される塩化シアヌルと式(4)で表されるエチルアミンとの反応には、当該分野で利用可能な公知の方法を適宜利用することができ、斯くして式(5)で表される2,4-ジクロロ-6-エチルアミノ-s-トリアジンに容易に導くことができる。

【0026】例えば、ジエチルエーテル等の不活性溶媒中でジイソプロピルエチルアミン等の塩基存在下、式(3)で表される塩化シアヌルと式(4)で表されるエチルアミンとを、冷却下反応させることにより、式(5)で表される2,4-ジクロロ-6-エチルアミノ-s-トリアジンが容易に製造できる。

【0027】式(5)で表される2,4-ジクロロ-6-エチルアミノ-s-トリアジンと一般式(6)で表されるアミノ酸化合物との反応には、当該分野で利用可能な公知の方法を適宜利用することができ、斯くして式(7)で表されるシメトリン化合物に容易に導くことができる。

【0028】例えば、テトラヒドロフラン等の不活性溶媒中でジイソプロピルエチルアミン等の塩基の存在下、式(5)で表される2,4-ジクロロ-6-エチルアミノ-s-トリアジンと一般式(6)で表されるアミノ酸化合物とを還流下反応させることにより、一般式(7)で表されるシメトリン化合物が容易に製造できる。

【0029】一般式(7)で表されるシメトリン化合物と式(8)で表されるメチルメルカプタンナトリウム塩との反応には、当該分野で利用可能な公知の方法を適宜利用することができ、斯くして一般式(9)で表されるシメトリン化合物に容易に導くことができる。

【0030】例えば、エタノール等の不活性溶媒中で一般式(7)で表されるシメトリン化合物と式(8)で表されるメチルメルカプタンナトリウム塩とを還流下反応させることにより、一般式(9)で表されるシメトリン化合物を容易に製造できる。

【0031】カルボキシル保護基Rの除去方法としては、例えばアルカリもしくは酸の存在下で一般式(9)の化合物を加水分解する方法等が挙げられる。ここで塩基性触媒としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ金属水酸化物、カリウム tert-ブトキシド等の有機金属塩基等を例示できる。また、酸性触媒としては、塩酸、硫酸等の鉱酸、酢酸、トリフルオロ酢酸等のカルボン酸、p-トルエンスルホン酸等のスルホン酸等を例示できる。この反応において、使用される溶媒としては、例えばメタノール、エタノール等のアル

コール類、テトラヒドロフラン、ジオキサン等のエーテル類、ジメチルスルホキシド等のスルホキシド類、ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素類、1,2-ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類、水又はこれらの混合溶媒等が挙げられる。該反応は通常0 からその使用する溶媒の沸点温度までの温度範囲で、好ましくは室温程度で進行し、一般に0.5~24時間程度で完結する。

【0032】また、カルボキシル保護基Rがベンジル基である場合、その除去は加水素分解によっても行うことができる。

【0033】斯くして本発明の一般式(1)で表されるシメトリン化合物が製造される。

【0034】上記各反応で得られる目的化合物は、各々通常の見分手段により反応系内より分離され、更に精製することができる。この分離及び精製手段としては、例えば蒸留法、再結晶法、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、親和クロマトグラフィー、プレパラティブ薄層クロマトグラフィー、溶媒抽出法等を採用できる。

【0035】前記反応において中間原料として用いられる一般式(6)のアミノ酸化合物は、商業的に入手可能なアミノ酸を公知の方法に従って反応することにより容易に製造することができる。

【0036】また、式(3)で表される塩化シアヌル、式(4)で表されるエチルアミン、式(8)で表されるメチルメルカプタンナトリウム塩は、いずれも商業的に容易に入手可能な化合物である。

【0037】前記一般式(1)で表されるシメトリン化合物は、シメトリンと特異的に反応する免疫学的反応体(例えば、抗体、より具体的にはポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体、又はシメトリンと結合可能な部位を含むそれらのフラグメント、あるいは抗血清等)の調製においてハプテンとして用いることができ、更に各種の免疫学的測定方法の開発に必要な標識抗原の調製に用いることができる。ここで「ハプテン」とは、抗体との結合能を有しているものの、それ単独では免疫原性を有さず、担体と結合することによって免疫原性を発現する物質を意味する。従って、一般にハプテンは、担体と結合するための官能基を有する。

【0038】前記一般式(1)で表される本発明のシメトリン化合物と担体又は標識物質との結合体の調製、抗血清及びポリクローナル抗体の調製、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの分離及びハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体の調製の方法は、いずれも常法、例えば、続生化学実験講座(日本生化学会編)又は免疫生化学研究法(日本生化学会編)に記載の方法で行うことができる。

【0039】前記一般式(1)で表されるシメトリン化合物との結合体を調製する際には、従来から、一般に用

いられている公知の担体を用いることができる。ここで、担体とは、ハプテンと結合（コンジュゲート化）してハプテンに免疫原性を付与する物質を意味する。担体としては、例えば生体高分子化合物、例えば、分子量が約1万以上、好ましくは約4万～100万のタンパク質（例えば、血清アルブミン、免疫グロブリン、オボアルブミン、ポリリジン、キーホールリンペットヘモシアニン等）、又は多糖類（例えばデキストラン、アミロース、アミロペクチン等）、あるいは細胞（例えば、哺乳類の赤血球、BCG菌等）等を挙げることができる。

【0040】一方、前記一般式（1）で表されるシメトリン化合物は、前記担体と結合することのできる官能基を有している。この官能基は、前記担体と結合することのできるものであればよく、用いる担体に応じて適宜選択することができる。

【0041】例えば、担体として高分子化合物であるタンパク質を用いる場合は、そのアミノ基と結合することのできる官能基として、例えばカルボキシル基、アルデヒド基、アミノ基、エポキシ基等を、またタンパク質のチオール基と結合することのできる官能基として、例えばチオール基、マレイミド基等を挙げることができる。また多糖類の場合には、水酸基と結合することのできる官能基として、例えばカルボキシル基、アルデヒド基、エポキシ基等を挙げることができる。

【0042】本発明のシメトリン化合物と担体との結合は、従来公知の方法を用いて行うことができる。例えば、担体として高分子化合物であるタンパク質を用いる場合には、混合酸無水物法、活性エステル法、カルボジイミド法等の従来公知の結合方法によって本発明シメトリン化合物とタンパク質との結合体を調製することができる。

【0043】また、本発明においては、前記一般式（1）で表されるシメトリン化合物を標識物質と結合させることができる。標識物質としては、公知の標識を用いることができ、例えば、酵素（例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等）、発光物質（例えば、ルミノール、アクリジニウム誘導體等）、蛍光物質（例えば、フルオレセイン、ユーロピウムキレート等）を挙げることができる。斯かる標識物質は、上記と同様の操作によって本発明のシメトリン化合物と結合させることができる。得られた結合体は、測定対象となるシメトリンとの競合反応に用いることができる。

【0044】本発明の免疫学的反応体は、例えば次のようにして調製される。

【0045】例えば、本発明による抗血清又はポリクローナル抗体の調製には、前記一般式（1）で表されるシメトリン化合物と担体との結合体を免疫原に用いることができる。免疫は、哺乳動物や鳥類（例えば、マウス、ウサギ、又は鶏等）へ、通常の方法、例えば、免疫原溶液を等量のフロイントの完全アジュバント又は不完全ア

ジュバントと乳化混合したものを接種（初回免疫）し、以後2～4週間の間隔で数回免疫することによって行うことができる。その後、免疫した動物から血液を採取し、ポリクローナル抗体を含む抗血清を調製する。その後、DEAEイオン交換クロマトグラフィー又はプロテインGアフィニティークロマトグラフィー等により、抗血清からポリクローナル抗体を精製することができる。【0046】また、前記一般式（1）で表されるシメトリン化合物と担体との結合体を免疫原に用い、本発明によるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを分離することができる。

【0047】例えば、最終免疫して数日後の動物（例えば、マウス）から脾臓を無菌的に取り出し、ステンレススチールメッシュ等で押しつぶして脾臓細胞を調製し、細胞融合工程に用いる。細胞融合の他の一方の親細胞であるミエローマ細胞（骨髄腫細胞）は、各種の公知の細胞株、例えば、P3・NS-1/1・Ag4.1 [Eur. J. Immunol., 5; 511-517 (1975)]、SP2/0-Ag14 [Nature, 276; 269-270 (1978)]、P3-X63-Ag8.653 [J. Immunol., 123; 1548-1550 (1979)]等を使用することができる。

【0048】細胞融合は、通常の方法、例えば、公知の融合促進剤を含む培地 [例えば、市販の細胞融合用ポリエチレングリコール（分子量1500；ベーリンガーマンハイム社製）] 中で、脾臓細胞とミエローマ細胞とをよく混合することによって行うことができ、細胞の混合比率も常法に従って、例えば、マウスの脾臓細胞に対してミエローマ細胞を約1/5～1/10程度の割合で行うことができる。融合後、選択用培地（例えば、HAT培地）を用いて、ハイブリドーマのみを増殖させる。それらの内、培養上清中に目的のモノクローナル抗体を分泌しているハイブリドーマは、例えば、培養上清のシメトリンとの反応性を酵素結合免疫測定法（ELISA）でスクリーニングすることによって確認し、選択することができる。また、これらのハイブリドーマは、通常、細胞クローニング法、例えば、限界希釈法を用いて分離でき、公知の培地で継代培養し、液体室素中で容易に長期間保存することができる。

【0049】また、ハイブリドーマ（モノクローナル抗体産生細胞）の産生するモノクローナル抗体は、これを培養することにより、容易に調製することができる。特に、イン・ビトロの培養では、例えば、5%二酸化炭素及び37℃条件下で培養に適した任意の培地を用いて培養することができる。好適にはダルベコ培地に10%ウシ胎児血清（以下「FBS」と略す）を含む培地（以下、「ダルベコ/10%FBS培地」と略す）を用いることができる。またイン・ビボの培養では、用いたミエローマと同種の動物、例えば、マウスの腹腔中で培養するの

が好ましい。これらの培養上清又は腹水を各々モノクローナル抗体溶液として用いることができる。

【0050】また、抗血清や培養上清、あるいは腹水を出発材料として、抗体を精製することもできる。抗体の精製には、タンパク質の精製に一般的な方法、例えば硫酸塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、プロテインAもしくはプロテインG結合ポリマー等を用いるアフィニティークロマトグラフィー、又は透析等の方法を適宜組み合わせ用いることができる。

【0051】本発明のシメトリンの免疫学的測定方法によれば、前記の免疫学的反応体（ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体、あるいは抗血清）を用いて実施するので、シメトリンを正確に分析することができる。すなわち、本発明の免疫学的測定方法によって、シメトリンの存在の検出、半定量的測定又は定量的測定を行うことができる。本発明による免疫学的測定方法は、シメトリンに特異的に反応する免疫学的反応体を用いることを除けば、それ以外の点では従来公知の免疫学的測定方法、例えば、酵素免疫測定方法、蛍光免疫測定方法又は放射性免疫測定方法等を適用することができる。

【0052】本発明方法に従えば、環境水中等に残留している可能性のある除草剤シメトリンを測定することができる。被検試料は、シメトリンを含有する試料である限り特に限定されるものではない。

【0053】本発明による免疫学的測定方法を、例えば、通常抗原標識法と呼ばれる方法、すなわち、上記抗体もしくは抗体フラグメントを固相化した後、シメトリン化合物と標識物質との結合体である標識化シメトリン化合物（標準品）と、試料中の検査対象化合物シメトリンとを競合阻害反応させる方法等に適用することができる。ここでは、本発明による免疫学的測定方法の内、抗原標識法について以下に説明する。

【0054】本発明方法は、例えば、

(1) シメトリンと特異的に反応する免疫学的反応体、特に抗体もしくは抗体フラグメントを固相化する（以下、「固相化抗体」と略す）工程；

(2) 被検試料が水性試料の場合には、その被検試料を濾紙等で濾過し、また被検試料が土壌等の場合には、被検試料中に含まれていることのあるシメトリンを抽出することのできる有機溶媒で被検試料を抽出処理し、検体を調製する工程；

(3) 前記固相化抗体と検体と標識化シメトリン化合物とを接触させ、反応させる工程；

(4) 固相化抗体に結合した標識化シメトリン化合物と、結合していない標識化シメトリン化合物とを分離する工程；

(5) 前記工程(4)で分離した、いずれか一方、好ましくは固相化抗体と結合した標識化シメトリン化合物に由来する信号を測定する工程からなる。

【0055】本発明方法を実施する場合には、前記のように、標識化シメトリン化合物を用いてシメトリンの確認又は定量を行うことができる。シメトリン化合物の標識には、公知の標識物、例えば、放射性同位体（例えば、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^3H 等）、酵素（例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等）、ビタミン（例えば、ビオチン等）、蛍光物質（例えば、FITC等）、又は化学発光物質（例えば、アクリジニウム等）等を用いることができる。

10 【0056】また、本発明方法では、固相化抗体と標識化シメトリン化合物との反応が終了した後で、固相化抗体に結合しなかった標識化シメトリン化合物を分離する。分離は、例えば、濾過、遠心処理又は緩衝液による洗浄によって行うことができる。

【0057】分離後、例えば固相化抗体と結合した標識化シメトリン化合物からの信号を測定することができる。信号を測定する際には、反応系を信号測定に適した条件に変えるのが好ましい。例えば、標識物として、蛍光又は化学発光物質を用いた場合には、消光が起こらない条件で信号を検出する。前記の免疫学的測定法においては、適当な対照液（例えば、固相化抗体とシメトリン化合物との結合体）をコントロールとして使用することができる。

【0058】

【実施例】以下、実施例を掲げて本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0059】実施例1

6 - メチルチオ - 4 - エチルアミノ - 2 - カルボキシプロピルアミノ - 1, 3, 5 - トリアジンの合成
塩化シアヌル(3) (4.6g、25ミリモル)をジエチルエーテル200mlに懸濁して、-15で冷却しながら1.68g(26ミリモル)のエチルアミン(4)(70%水溶液)と3.36g(26ミリモル)のジイソプロピルエチルアミンのジエチルエーテル溶液25mlを20分かけて滴下した。-15から0で1.5時間攪拌した後反応液を濾過し、順次1N塩酸(13ml)、5%炭酸水素ナトリウム溶液(13ml)、飽和食塩水(15ml x 2)で洗浄、無水硫酸マグネシウム乾燥後、濾過し、濾液を減圧下濃縮した。粗生成物をn - ヘキサン / ジエチルエーテルから再結晶化し、無色結晶として1.31g(収率64%)の2, 4 - ジクロロ - 6 - エチルアミノ - 1, 3, 5 - トリアジン(5)を得た。

【0060】1.93g(10ミリモル)の2, 4 - ジクロロ - 6 - エチルアミノ - 1, 3, 5 - トリアジン(5)、1.44g(11ミリモル)の4 - アミノ酪酸エチル(6)、1.42g(11ミリモル)のジイソプロピルエチルアミンをテトラヒドロフラン(THF)400mlに加えて、5時間還流した。反応液を室温まで冷

却後、60mlの酢酸エチルを加えて、順次1N塩酸(13ml)、5%炭酸水素ナトリウム水溶液(13ml)、飽和食塩水(15ml×2)で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥後濾過し、濾液を減圧下濃縮して得た残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ベンゼン：酢酸エチル=9：1～1：1)で精製し、無色不定形固体として1.0g(収率35%)の2-クロロ-4-エチルアミノ-6-エトキシカルボニルプロピルアミノ-1,3,5-トリアジン(7)を得た。

【0061】1.0g(3.47ミリモル)の2-クロロ-4-エチルアミノ-6-エトキシカルボニルプロピルアミノ-1,3,5-トリアジン(7)、0.25g(3.47ミリモル)のメチルメルカプタンナトリウム塩(8)を無水エタノールに加えて、24時間還流した。反応液を濃縮し、残渣に水30mlを加え、30mlの酢酸エチルで2回抽出した。合わせた酢酸エチル抽出液を飽和食塩水(30ml×2)で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥後濾過し、濾液を減圧下濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ベンゼン：酢酸エチル=7：1～1：1)で精製し、無色不定形固体として0.68g(収率65%)の2-エチルアミノ-4-エトキシカルボニルプロピルアミノ-6-メチルチオ-1,3,5-トリアジン(9)を得た。

【0062】0.68g(2.27ミリモル)の2-エチルアミノ-4-エトキシカルボニルプロピルアミノ-6-メチルチオ-1,3,5-トリアジン(9)をエタノール10mlに溶解し、冷却しながら、0.68g(3.4ミリモル)の20%水酸化ナトリウム水溶液を滴下した2時間室温で攪拌後、反応液を濃縮した。残渣を3mlの水に溶解し、冷却しながら1N塩酸で中和し、酢酸エチル(30ml×2)で抽出した。合わせた酢酸エチル抽出液を飽和食塩水(15ml×2)で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥後濾過し、濾液を減圧下濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ベンゼン：酢酸エチル=1：1)で精製し、無色不定形固体として0.47g(収率76%)の標題の目的化合物である4-エチルアミノ-2-カルボキシプロピルアミノ-6-メチルチオ-1,3,5-トリアジンを得た。

【0063】実施例2

シメトリン化合物と担体タンパク質との結合体の調製
免疫原としてスカシガイヘモシアニン(KLH)と本発明のシメトリン化合物(ハプテン)の結合体を混合酸無水物法を用いて作製した。

【0064】上記実施例1で製造した4-エチルアミノ-2-カルボキシプロピルアミノ-6-メチルチオ-1,3,5-トリアジンの25mgを2mlの無水ジオキサランに溶解し、0.05mlのN-メチルホルホルリンを加えて10で20分間攪拌し、更に0.02mlのクロロ蟻酸イソブチルを少しずつ添加し20分間攪拌し

て、4-エチルアミノ-2-カルボキシプロピルアミノ-6-メチルチオ-1,3,5-トリアジンの混合酸無水物を調製した。一方、80mgのKLHを4.3mlの蒸留水に溶解したのち、1NのNaOHでpH9.5に調整し、さらに10でジオキサラン2.6mlを滴下した。このKLH溶液に、1NのNaOH溶液でpH9に保ちながら先に調製した4-エチルアミノ-2-カルボキシプロピルアミノ-6-メチルチオ-1,3,5-トリアジンの混合酸無水物溶液を徐々に滴下し、4で4時間攪拌した。反応終了後、4で一晩蒸留水に対して透析した後、凍結乾燥してフリーザー内に貯蔵した。こうして得られたシメトリン化合物とKLHとの結合体を免疫原として使用した。

【0065】また、コーティング抗原として用いるために、4-エチルアミノ-2-カルボキシプロピルアミノ-6-メチルチオ-1,3,5-トリアジンとウサギ血清アルブミン(RSA)との結合体も同様の方法で調製した。

【0066】実施例3

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作成と抗体の作製

実施例2で調製した免疫原を1mg/mlになるように生理的リン酸緩衝液に溶解し、アジュバントと等量混合した後、Balb/cマウスに100μlをマウス腹腔内に投与した。その後、2週間毎に追加免疫した。尾血管から採取した血液の血清中の抗体力価が高くなったマウスの脾臓を摘出し、DMEM培地(ダルベコ改変イーグル培地)を入れたシャーレ内で摘出した脾臓をハサミで傷をつけ、注射筒で培地を脾臓内に注入して細胞を追い出した。培地を遠沈管に移し、大きな組織片を沈降させるために5分間静置した。脾臓細胞が浮遊している上清を静かに取り、単細胞の懸濁液を300×g、4分間遠心して細胞を集め、脾臓細胞を調製した。マウスのミエローマ細胞(P3X63Ag8.653)を細胞数の比で5：1(ミエローマ細胞：脾臓細胞)になるように混合し、300×g、4分間遠心して細胞を集めた。次に、DMEM培地に沈殿細胞を懸濁し、37に暖めておいた50%ポリエチレングリコール(分子量1,500)溶液1mlを60秒かけてゆっくり加え細胞融合を行った。DMEM培地10mlを加えた後、牛胎児血清1mlを添加した。遠心によって集められた細胞を細胞数が5×10⁵個/mlになるように調製した。細胞懸濁液を96穴プラスチックプレートに100μl/ウェルの量を分注して、37にて5%二酸化炭素の気相中でインキュベーションした。毎日ウェル中の培地の半量をHAT培地で置換して、10日から14日間培養した。培養液中の抗体の活性をELISA法で調べ、目的とする抗体を産生しているウェルの細胞について、96穴のプラスチックプレートで、HAT培地を用い、限界希釈法によりハイブリドーマのクローニングを行った。

クローニングした結果、最終的に抗シメトリン抗体を産生している安定なハイブリドーマ2株を得た。これらの株をそれぞれSMT3110及びSMT3111と名付け、このハイブリドーマ株をDMEMに10%牛胎児血清を含む培地で培養した。培養液の遠心上清をモノクローナル抗体溶液とし、それぞれ「モノクローナル抗体SMT3110」（以下単に「抗体SMT3110」という）及び「モノクローナル抗体SMT3111」（以下単に「抗体SMT3111」という）とした。調製したモノクローナル抗体溶液はPBSで希釈して抗原固相化し、競合間接ELISA法によりシメトリンの反応性を調べた。

【0067】以下にモノクローナル抗体とシメトリンとの反応性の測定例を示す。

1) 96穴マイクロプレートにシメトリンとRSAとの結合体(2ng/ml)を100µl/ウェルの量を加えて4で一晚インキュベーションしてプレートに吸着させた。洗浄緩衝液で5回洗浄後、3%スキムミルク溶液又は4倍希釈のブロックエース(Block-Ace、大日本製薬(株)製)溶液の300µl/ウェル量を加え、25で1時間インキュベーションした後、プレートを洗浄した。

2) モノクローナル抗体をPBSで50倍に希釈した溶液とシメトリン溶液の各々50µlをウェルに加え、1時間インキュベーションした後、プレートを洗浄した。

3) 西洋ワサビペルオキシダーゼを結合した抗マウスIgGヤギ抗体(第二抗体)をPBSで2,000倍に希釈し、100µl/ウェルを加え、25で1時間又は4で2時間インキュベーションした後、プレートを洗浄した。

4) 0.2%のo-フェニレンジアミン発色溶液(100mMリン酸クエン酸緩衝液(PH5.0)、0.003%過酸化水素水)の200µl/ウェルを加え、25で10分間インキュベーションした後、4N硫酸50µl/ウェルを加えて酵素反応を止め、492nm及び630nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

【0068】抗シメトリン抗体を用いた場合のELISA法によるシメトリンとRSAとの結合体の濃度は2µg/mlを用い、抗体の50倍希釈溶液とメタノールに溶解したシメトリン標準ストック溶液を0.1ng/mlから1,000ng/mlの濃度になるようにPBSで段階的に希釈した溶液をウェルに加え、第二抗体を2,000倍に希釈したものをを用いることにより作成したシメトリンの標準阻害曲線を図1に示す。阻害率は次式より算出して示した。

【0069】阻害率(%) = (標準試料の吸光度 / コントロールの吸光度) × 100

測定の結果、25で1時間インキュベーションした場合の測定可能範囲は1~70ng/mlであり、50%阻害

を示す値(IC₅₀値)は8.5ng/mlであった。また、4で2時間インキュベーションした場合の測定可能範囲は0.2~30ng/mlであり、50%阻害を示す値(IC₅₀値)は2.6ng/mlであった。

【0070】実施例4

ハイブリドーマ細胞のマウス腹腔内培養による抗体の調製

13週齢の雄性Balb/cマウスに免疫能を低下させるために0.5mlのプリスタン(pristane: 2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン)を腹腔内に注射した。10日後、増殖期のハイブリドーマ細胞SMT3101をPBS緩衝液中に1×10⁶~1×10⁷個/mlを浮遊した0.5mlを腹腔内に注射した。腹部が肥大したら注射針を刺し、腹水を集め3,000rpmで30分間遠心した。3層に分離した中間層を集め、33%の飽和硫酸アンモニウムで塩析して沈殿をPBS緩衝液で透析した。調製した抗体を固相化した競合直接ELISA法(dc-ELISA)によりシメトリンの反応性を調べた。

【0071】以下に抗体とシメトリンとの反応性の測定例を示す。1) 96穴マイクロプレートにシメトリン抗体SMT3110(100ng/ml)を70µl/ウェルの量を加えて4で一晚インキュベーションしてプレートに吸着させた。洗浄緩衝液で5回洗浄後、3%スキムミルク溶液又は4倍希釈のブロックエース(Block-Ace、大日本製薬(株)製)溶液の250µl/ウェル量を加え、25で1時間又は4で2時間インキュベーションした後、プレートを洗浄した。2) シメトリン-西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体溶液を1,500倍に希釈した溶液とシメトリン溶液の各々50µlをウェルに加え、1時間インキュベーションした後、プレートを洗浄した。3) 0.2%のo-フェニレンジアミン発色溶液(100mMリン酸クエン酸緩衝液(PH5.0)、0.003%過酸化水素水)の200µl/ウェルを加え、25で10分間インキュベーションした後、4N硫酸の50µl/ウェルを加えて酵素反応を止め、492nm及び630nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

【0072】腹腔液抗シメトリン抗体を用いた場合の直接競合ELISA法(dc-ELISA)法によるコーティング抗体の濃度は70ng/mlを用い、1,500倍に希釈したシメトリン-西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体溶液とシメトリン標準ストック溶液を0.1ng/mlから1,000ng/mlの濃度になるようにPBSで段階的に希釈した溶液をウェルに加えて作成したシメトリンのdc-ELISA標準阻害曲線を図2に示す。

【0073】測定の結果、25で1時間インキュベーションした場合の測定可能範囲は2~150ng/mlであり、50%阻害を示す値(IC₅₀値)は15.85ng

/mlであった。また、4 で2時間インキュベートした場合の測定可能範囲は0.5~50ng/mlであり、50%阻害を示す値(IC₅₀値)は4.3ng/mlであった。

【0074】実施例5

抗体のシメトリン構造類似化合物に対する交差反応性

シメトリンの構造の一部を構成しているメチルチオ-トリアジン基又はクロルトリアジン基を有する化合物につ

いて抗体SMT3110の交差反応性を調べた。交差反*

抗シメトリンモノクローナル抗体SMT3110のシメトリン構造類似化合物に対する交叉反応性

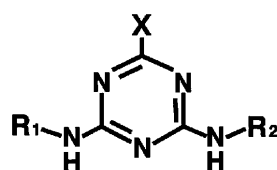
*応性は試験化合物のIC₅₀値を求め、次式より計算した。

【0075】交差反応率(%)=(シメトリンのIC₅₀値/試験化合物のIC₅₀値)×100

上記式を用いて交差反応率を算出した結果を表1に示す。

【0076】

【表1】



R ₁	R ₂	X	化合物	IC50値 (ppb)	交叉反応率 (%)
CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	SCH ₃	シメトリン	8.5	100
CH ₂ CH ₃	(CH ₂) ₃ COOH	SCH ₃	シメトリンカルボン酸誘導体	45	18.8
CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂	SCH ₃	アメトリン	76	11.2
CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂	SCH ₃	ジメタメトリン	61	13.9
CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂	SCH ₃	プロメトリン	851	0.9
CH ₂ CH ₃	C(CH ₃) ₃	SCH ₃	テルプトリン	66	12.8
	C(CH ₃) ₃	SCH ₃	イルガロール	27	31.0
CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	OCH ₃	シメトン	266	3.2
CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	Cl	シマジン	3940	0.2
CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂	Cl	アトラジン	8446	0.1
CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	OH	2-水酸化シメトリン	>10000	<0.1
CH ₂ CH ₃	H	OH	脱エチル-2-水酸化シメトリン	>10000	<0.1
H	H	OH	ジ脱エチル-2-水酸化シメトリン	>10000	<0.1

【0077】表1から次のことが判る。すなわち、抗体SMT3110は試験した化合物のアメトリン、ジメタメトリン、テルプトリン及び船底の汚染剤であるイルガロールと、それぞれ11.2%、13.9%、12.8%及び31.0%程度反応したが、他の化合物とは殆ど反応しなかった。この結果より本抗体のシメトリンに対する結合様式は、この分子が有する2-又は4-エチルアミノ及び6-メチルチオ基を含むs-トリアジン化合物と結合すると推測され、シメトリンに対して非常に特異性の高い抗体であるといえる。

【0078】実施例6

水試料へのシメトリンの添加回収試験

水試料は神戸市の水道水、神戸大学農学部近くを流れ

る河川水(小川)、校内の実験圃場の水田から採取した水田水についてシメトリンの添加回収試験を実施した。水道水及び河川水については採取した試料をそのまま用い、また、水田水については孔径が0.45μmのメンブレンフィルターで濾過した試料を用い、各試料にシメトリンを0.6ng/mlから1000ng/mlの範囲の濃度になるように添加した。シメトリンを添加した試料は抗体SMT3110を用いて実施例3に記載のELISA法によって測定し、水道水、河川水及び水田水についてそれぞれの添加回収試験の結果を表2に示す。

【0079】

【表2】

18
水試料の添加回収試験

水試料	添加濃度 (ppb)	測定平均濃度±SD (ppb)	添加回収率 (%)	変動係数 (%)
河川水 (n=9)	5	5.1 ± 0.6	101	11
	10	9.1 ± 1	95	11
	50	51 ± 4	102	8
水田水 (n=9)	5	4.5 ± 0.5	90	11
	10	11 ± 1	109	10
	50	49 ± 4	97	9
水道水 (n=9)	5	5.5 ± 0.7	110	12
	10	10 ± 1	98	10
	50	50 ± 4	101	8

【0080】表2から、既知濃度のシメトリン添加回収率は90～110%という高いことが判る。

【0081】また、0.6 ng/mlから1000 ng/mlの濃度のシメトリンを添加した試料の阻害曲線を図3に示す。図3によると、PBS緩衝液の曲線とよく重なり、水試料についてはシメトリン濃度0.1 ng/mlから100 ng/mlの範囲で測定が可能であることが判る。

【0082】実施例7

水田土壌へのシメトリンの添加回収試験

水田土壌(湿土)にシメトリン0.5 μg/g、1 μg/g又は5 μg/gを添加し、メタノール2.0 mlで2*

*回抽出した溶液をPBS緩衝液で希釈した試料を実施例3に記載のELISA法によって測定した。

【0083】一方、その測定値の確認のために高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による測定も実施した。ロータリエバポレーターでメタノールを留去した水溶液を、固相抽出法(Sep-Pak C18カートリッジを使用)によって吸着させた後、アセトニトリル10 mlで溶出し、濃縮後HPLC(検出波長230 nm)で測定した。

【0084】結果を表3に示す。

【0085】

【表3】
土試料の添加回収試験

試料	添加濃度 (ppb)	測定平均濃度±SD (ppb)	添加回収率 (%)	変動係数 (%)
土壌 (n=9)	500	475 ± 50	95	11
	1000	969 ± 40	98	4
	5000	4872 ± 200	96	4

【0086】表3に示すように、シメトリン添加回収率は95～98%であった。

【0087】ELISA法による回収率とHPLCによる回収率との関係を図4に示す。この図4から、ELISA法による回収率とHPLCによる回収率との間に高い相関関係が認められた。そのため、土壌試料については、メタノールで抽出した抽出液をPBS緩衝液で希釈することにより、シメトリン0.5～5 μg/gの範囲で測定が可能であることが判明した。

【0088】以上の結果から、次のことが明らかになっ

た。シメトリンと担体蛋白質との結合体をマウスに免疫して得られた脾臓細胞とミエローマ細胞を融合することにより、シメトリンと結合する抗体を産生する融合細胞を選抜した。この細胞を培養した培養上清を抗体として用い、シメトリンを測定するためのELISA法の最適条件を決定した。このELISA法によって河川及び水田水へのシメトリン添加回収試験の結果は良好な回収率が得られ、さらに、水田土壌のシメトリンの濃度の測定も可能であった。このように河川水中や水田水中のシメトリンの濃度をモニタリングするに当たっては、本EL

ISA法による簡便、迅速な方法が適していた。

【図面の簡単な説明】

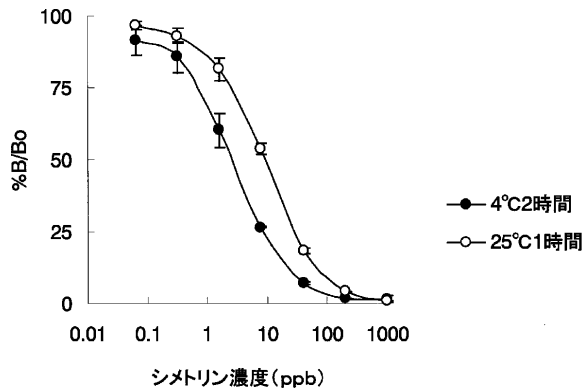
【図1】図1は、間接競合ELISA法によるシメトリンの標準曲線である。

【図2】図2は、直接競合ELISA法によるシメトリンの標準曲線である。*

*【図3】図3は、水試料におけるシメトリンの標準曲線である。

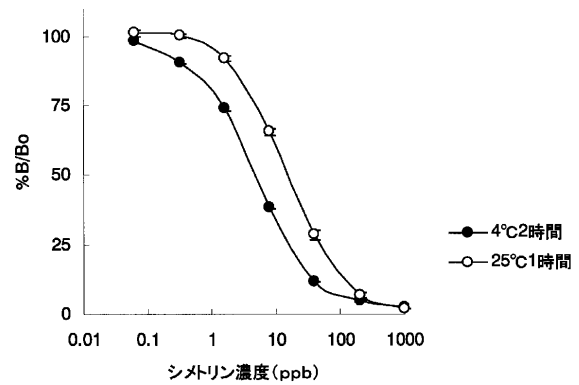
【図4】図4は、ELISA法によるシメトリン回収率とHPLCによるシメトリン回収率との関係を示すグラフである。

【図1】



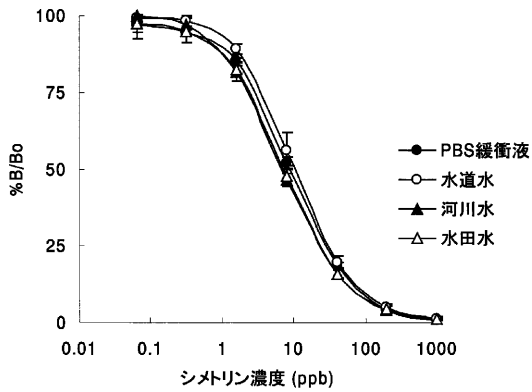
間接競合ELISAによるシメトリン標準曲線

【図2】



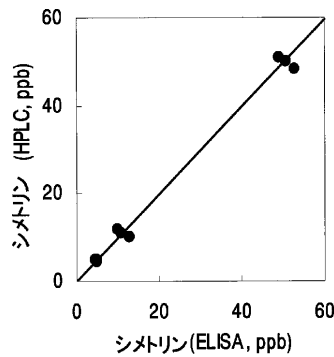
直接競合ELISAによるシメトリン標準曲線

【図3】



水試料における標準曲線

【図4】



土壌試料におけるELISAとHPLCによる添加回収試験の相関性
n=9, r²=0.99, y=0.98x+0.13

フロントページの続き

(72)発明者 森宗 孝介
徳島県鳴門市里浦町里浦字花面615番地
大塚化学株式会社鳴門研究所内

专利名称(译)	Simetryn化合物，免疫反应物，杂交瘤和测量simetryn的方法		
公开(公告)号	JP2002145870A	公开(公告)日	2002-05-22
申请号	JP2000341294	申请日	2000-11-09
申请(专利权)人(译)	大冢化学株式会社		
[标]发明人	大川秀郎 中田昌伸 石内雅丈 森宗孝介		
发明人	大川 秀郎 中田 昌伸 石内 雅丈 森宗 孝介		
IPC分类号	G01N33/53 C07D251/52 G01N33/15 G01N33/566 G01N33/577		
FI分类号	C07D251/52.E G01N33/15.C G01N33/53.G G01N33/566 G01N33/577.B		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的目的是提供一种新颖的西甲菊酯化合物，其可适用于简单，快速的方法来测量土壤，稻田排水沟，河流等环境水中的香茅素浓度。本发明的西咪替丁化合物具有通式：[在公式中，n表示1到9的整数。]表示。此外，根据本发明，提供了一种西咪替丁化合物与载体或标记物的缀合物，与西咪替丁具有反应性的免疫反应物等。

