

(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2003 - 166991

(P2003 - 166991A)

(43)公開日 平成15年6月13日(2003.6.13)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	G 4 B 0 2 4
C 0 7 C229/18		C 0 7 C229/18	4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/44		C 0 7 K 16/44	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10		G 0 1 N 33/577	B 4 H 0 0 6
15/02		C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 10数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 366162(P2001 - 366162)

(22)出願日 平成13年11月30日(2001.11.30)

(71)出願人 000206901

大塚化学ホールディングス株式会社

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 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

(74)代理人 100065215

弁理士 三枝 英二 (外 8 名)

最終頁に続く

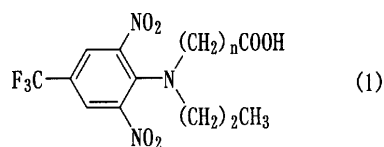
(54)【発明の名称】 トリフルラリン化合物、免疫学的反応体、ハイブリドーマ及びトリフルラリンの測定方法

(57)【要約】

【課題】 本発明は、土壌、河川等の環境水中におけるトリフルラリンの濃度の簡便、迅速な測定法に好適に使用され得る新規トリフルラリン化合物を提供することを課題とする。

【解決手段】 本発明のトリフルラリン化合物は、一般式

【化 1】

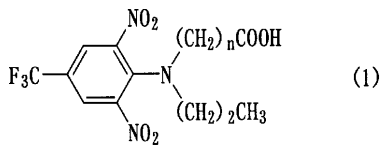


[式中、nは1～9の整数を示す。]で表される。また、本発明によれば、トリフルラリン化合物と担体又は標識物質との結合体、トリフルラリン等に反応性を有する免疫学的反応体等が提供される。

【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。]で表されるトリフルラリン化合物。

【請求項2】 請求項1に記載のトリフルラリン化合物と担体又は標識物質との結合体。

【請求項3】 トリフルラリン及び請求項1に記載のトリフルラ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トリフルラ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、トリフルラリン化合物、免疫学的反応体、ハイブリドーマ及びトリフルラリンの測定方法に関する。

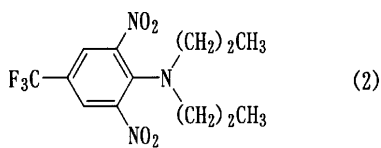
【0002】

【従来の技術】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。

【0003】トリフルラリン、即ち、 $\text{F}_3\text{C}-\text{C}_6\text{H}_2(\text{NO}_2)_2-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ - トリフルオロ - 2, 6 - ジニトロ - N, N - ジブロピル - p - トルイジンは、式(2)

【0004】

【化2】



【0005】で表される構造を有する化合物である。トリフルラリンは、土壌処理型の非選択性除草剤であり、

一年生イネ科雑草及び広葉雑草に対して除草効果を発現する。

【0006】トリフルラリンは、畑作地で広く用いられていることから、畑作地土壌及びその周辺の河川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。

【0007】従来、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トリフルラリンを、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る。

【0008】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、トリフルラリンへの適用は、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。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、新規なトリフルラリン化合物を提供することを課題とする。

【0010】本発明は、トリフルラリンの測定方法を提供することを課題とする。

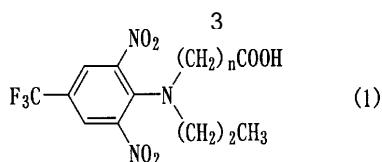
【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、畑作地の土壌、河川等の環境水中等におけるトリフルラリンの濃度の簡便、迅速な測定法として、トリフルラリンに対して反応性を有する抗体を用いる免疫化学的測定法の適用を検討してきた。その結果、下記一般式(1)で表されるトリフルラ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トリフルラリン化合物と担体との結合体が、トリフルラ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トリフルラ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、トリフルラ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。

【0012】本発明によれば、一般式(1)

【0013】

【化3】



【0014】[式中、nは1～9の整数を示す。]で表されるトリフルラリン化合物が提供される。

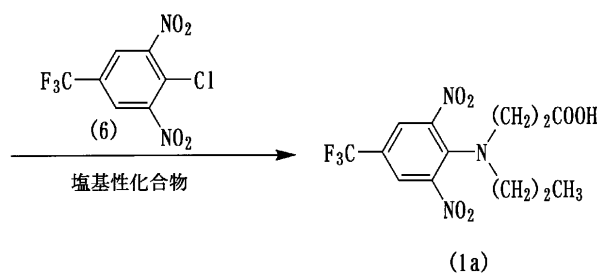
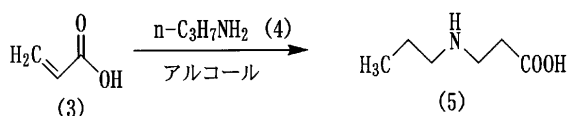
【0015】また、本発明によれば、前記一般式(1)で表されるトリフルラリン化合物と担体又は標識物質との結合体が提供される。

【0016】また、本発明によれば、トリフルラリン及び前記一般式(1)で表されるトリフルラ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。

【0017】また、本発明によれば、トリフルラリン及び前記一般式(1)で表されるトリフルラ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するハイブリドーマが提供される。

【0018】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トリフルラリンの免疫学的測定方法が提供される。

【0019】本発明方法によれば、トリフルラリン分析*



【0024】即ち、式(1a)で表される本発明化合物は、アクリル酸(3)とn-プロピルアミン(4)とを反応させて、式(5)で表される化合物に導き、次いでこの化合物(5)を式(6)で表される化合物と反応させることにより製造される。

【0025】アクリル酸(3)とn-プロピルアミン(4)との反応は、例えばメタノール、エタノール、イソプロピルアルコール等のアルコール溶媒中で行われる。

【0026】化合物(5)とニトロベンゼン化合物(6)との反応は、例えば塩基性化合物の存在下で行わ

*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。

【0020】

【発明の実施の形態】以下、本発明のトリフルラリン化合物及びその合成方法、トリフルラ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際に説明する。

【0021】本発明の一般式(1)で表されるトリフルラリン化合物は、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。

【0022】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のうちnが2を示す化合物は、下記反応式-1に示す方法に従い、製造される。

【0023】

【化4】

れる。塩基性化合物としては、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ金属水酸化物等が挙げられる。

【0027】斯くして本発明の式(1a)で表されるトリフルラリン化合物が製造される。

【0028】また、一般式(1)で表される本発明化合物(n=1～9)は、下記反応式-2、反応式-3に示す方法に従い、製造される。

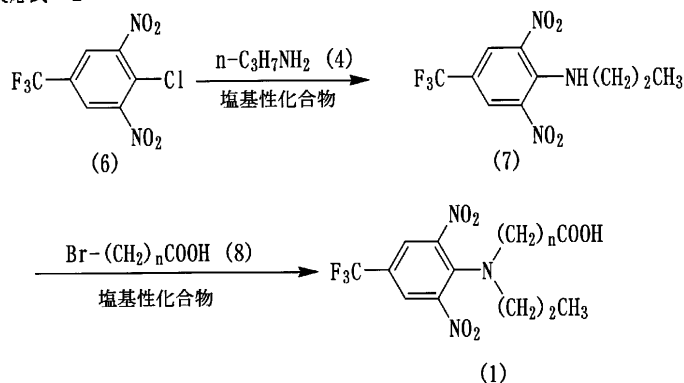
【0029】

【化5】

(4)

6

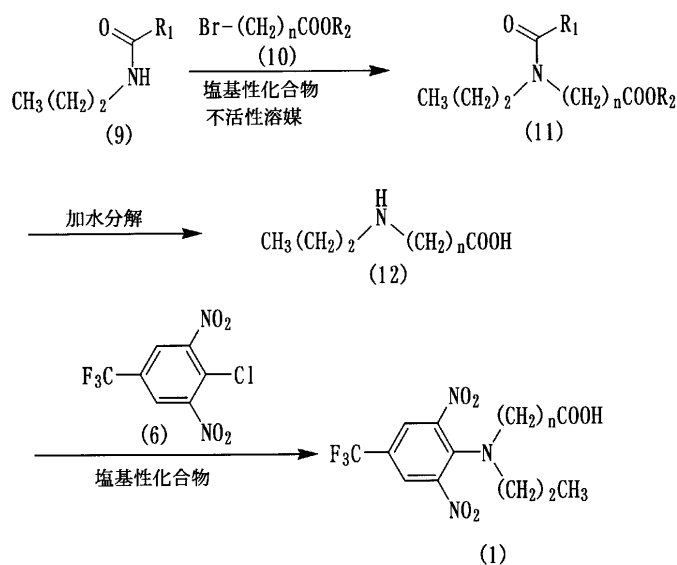
反応式 - 2



【 0 0 3 0 】

* * 【 化 6 】

反応式 - 3



【 0 0 3 1 】 [反応式 - 2 及び 3 において、n は前記に同じ。R¹ は水素原子又は C₁₋₆ の直鎖又は分枝鎖状アルキル基を示す。R² は C₁₋₆ の直鎖又は分枝鎖状アルキル基を示す。]

反応式 - 2 によれば、一般式 (1) で表される本発明化合物は、ニトロベンゼン化合物 (6) と n - プロピルアミン (4) とを反応させて、式 (7) で表される化合物に導き、次いでこの化合物 (7) を一般式 (8) で表される化合物と反応させることにより製造される。

【 0 0 3 2 】 ニトロベンゼン化合物 (6) と n - プロピルアミン (4) との反応は、例えば不活性溶媒中、塩基性化合物の存在下に行われる。

【 0 0 3 3 】 化合物 (7) と化合物 (8) との反応は、例えばエタノール等の適当な溶媒中、水酸化ナトリウム等の塩基性化合物の存在下に行われる。

【 0 0 3 4 】 反応式 - 3 によれば、一般式 (1) で表される本発明化合物は、一般式 (9) で表される化合物とアルキルエステル (10) とを反応させて一般式 (11) で表される化合物に導き、次いでこの化合物 (11) を加水分解して一般式 (12) で表される化合物に導き、更にこの化合物 (12) をニトロベンゼン化合物

(6) と反応させることにより製造される。

【 0 0 3 5 】 化合物 (9) とアルキルエステル (10) との反応は、例えばジメチルホルムアミド等の適当な溶媒中、水酸化ナトリウム等の塩基性化合物の存在下に行われる。

【 0 0 3 6 】 化合物 (11) の加水分解には、酸又は塩基性化合物を用いる通常の加水分解条件を広く適用できる。

【 0 0 3 7 】 化合物 (12) とニトロベンゼン化合物 (6) との反応は、適当な溶媒中、水酸化ナトリウム等の塩基性化合物の存在下に行われる。溶媒としては、例えばメタノール、エタノール、イソプロピルアルコール等のアルコール溶媒等が挙げられる。塩基性化合物としては、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ金属水酸化物等が挙げられる。

【 0 0 3 8 】 上記各反応式において出発原料として用いられる化合物 (3)、化合物 (4)、化合物 (6)、化合物 (8)、化合物 (9) 及び化合物 (10) は、いずれも入手容易な公知化合物であるか、又は公知の方法により容易に製造できる化合物である。

【 0 0 3 9 】 上記各反応で得られる目的化合物は、各々

通常の分離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。

【0040】一般式(1)で表されるトリフルラリン化合物は、トリフルラ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、又はトリフルラ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。

【0041】前記一般式(1)で表される本発明のトリフルラ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。

【0042】前記一般式(1)で表されるトリフルラ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)、多糖類(例えばデキストラン、アミロース、アミロペクテン等)、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。

【0043】本発明のトリフルラ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トリフルラ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。

【0044】また、本発明においては、前記一般式(1)で表されるトリフルラ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体等)、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トリフルラ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、測定対象となるトリフルラリンとの競合反応に用いることができる。

【0045】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。

【0046】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)で表されるトリフルラ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、ラット、ウサギ、ウマ又は鶏等)へ、通常の方法、例えば、免疫原溶液を等量のプ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、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。

【0047】また、前記一般式(1)で表されるトリフルラ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。

【0048】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)], P3-U1, MPC-11, FD, X63.55.3, S194等を使用することができる。

【0049】細胞融合は、通常の方法、例えば、公知の融合促進剤及び場合により補助剤を含む培地中で、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5~10倍程度の割合で行うことができる。融合促進剤としては、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)等が使用され、補助剤としては、例えば、ジメチルスルホキシド等が使用される。培地としては、例えば、40%

(W/V)ポリエチレングリコールを含むダルベコ改変イーグル培地(DMEM)等を用いることができる。

【0050】細胞融合後、毎日培養液の半量を選択用培地(例えば、HAT培地)と交換することによって、ハイブリドーマ(融合細胞)以外の細胞を除去し、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、培養上清のトリフルラ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、液体窒素中で容易に長期間保存することができる。ハイブリドーマを培養する培地としては、例えばDMEM又はMEMに10%ウシ胎児血清を含む培地等が用いられる。

【0051】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、5~7%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、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。

【0052】また、抗血清、培養上清、腹水等を出発材料として、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、分子篩ゲルを用いる分子篩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、透析、凍結乾燥等の方法を適宜組み合わせ用いることができる。

【0053】本発明のトリフルラ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、トリフルラ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、トリフルラリンの存在の検出、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、トリフルラ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。

【0054】本発明方法に従えば、土壌、環境水中等に残留している可能性のある除草剤トリフルラリンを測定

することができる。被検試料は、トリフルラ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。

【0055】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、例えば、上記抗体もしくは抗体フラグメントを固相化した後、トリフルラリン化合物及び標識物質の結合体である標識化トリフルラリン化合物(標準品)と、試料中の検査対象化合物であるトリフルラ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。

【0056】本発明方法は、例えば、(1)トリフルラ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トリフルラ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トリフルラ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トリフルラリン化合物と、固相化抗体に結合していない標識化トリフルラリン化合物とを分離する工程；

(5)前記工程(4)で分離した、いずれか一方の化合物、好ましくは固相化抗体と結合した標識化トリフルラリン化合物に由来する信号を測定する工程を含む。

【0057】本発明方法を実施する場合には、前記のように、標識化トリフルラリン化合物を用いてトリフルラリンの確認又は定量を行うことができる。トリフルラ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。

【0058】また、本発明方法では、固相化抗体と標識化トリフルラ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トリフルラ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。

【0059】分離後、例えば固相化抗体と結合した標識化トリフルラ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、固相化抗体とトリフルラ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。

【0060】

【発明の効果】本発明によれば、土壌、河川等の環境水中におけるトリフルラリン濃度の簡便、迅速な測定法に好適に使用され得る新規トリフルラリン化合物が提供される。

【0061】本発明の免疫学的測定法により、トリフルラ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。

【0062】

【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。

【0063】実施例1

、
、
-トリフルオロ-2,6-ジニトロ-N-プロピル-N-カルボキシエチル-p-トルイジンの合成
アクリル酸(3)2.2g(30ミリモル)及びn-プロピルアミン(4)1.8g(30ミリモル)をエタノール100mlに溶解し、2時間還流した。反応混合物を減圧下に濃縮して、3-プロピルアミノプロピオン酸(5)3.9g(定量的)を得た。

【0064】上記で得られた3-プロピルアミノプロピオン酸(5)3.9g(30ミリモル)を2規定の水酸化ナトリウム水溶液15mlに溶解し、冷却攪拌下に4-クロロ-3,5-ジニトロベンゾトリフルオライド(6)を加え、更に2規定の水酸化ナトリウム水溶液15mlを加えた。一晩室温で攪拌後、反応混合物をジエチルエーテルで洗浄し、水層を冷却しながら濃塩酸でpHを約1に調整した。

【0065】析出物を酢酸エチル30mlで2回抽出し、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た。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン：酢酸エチル=4:1)で精製し、赤橙色油状物として2.5g(収率23%)の標題の目的化合物である、
、
-トリフルオロ-2,6-ジニトロ-N-プロピル-N-カルボキシエチル-p-トルイジンを得た。

【0066】実施例2

トリフルラリン化合物と担体タンパク質との結合体の調製

免疫原としてウシ血清アルブミン(BSA)と本発明のトリフルラリン化合物(ハプテン)の結合体を混合酸無水物法を用いて作製した。

【0067】上記実施例1で製造した、
、
-トリフルオロ-2,6-ジニトロ-N-プロピル-N-カルボキシエチル-p-トルイジン7.85mgを1mlの無水ジオキサランに溶解し、0.025µl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0.01µlのクロロ蟻酸イソブチルを少しづつ添加し20分間攪拌して、
、
-トリフルオロ-2,6-ジ

ニトロ-N-プロピル-N-カルボキシエチル-p-トルイジンの混合酸無水物を調製した。

【0068】一方、16.8mgのBSAを1ml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でジオキサン1.3mlを滴下した。このBSA溶液に、1NのNaOH溶液でpH9に保ちながら先に調製した、
、
-トリフルオロ-2,6-ジニトロ-N-プロピル-N-カルボキシエチル-p-トルイ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。

【0069】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。こうして得られたトリフルラリン化合物とBSAとの結合体を免疫原として使用した。

【0070】また、コーティング抗原として用いるために、
、
-トリフルオロ-2,6-ジニトロ-N-プロピル-N-カルボキシエチル-p-トルイ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。

【0071】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2mg/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、DME M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。

【0072】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、5分間遠心して細胞を集め、脾臓細胞を調製した。

【0073】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、5分間遠心して細胞を集めた。上清を除去し、遠心管をはじいて沈殿細胞をほぐした後、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。DME M培地9mlを加えた後、ウシ胎児血清を含むDME M培地40ml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HAT培地を加えた。

【0074】細胞懸濁液を96穴プラスチックプレートに250µl/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。1週間後、ウェル中の培地の半量をHAT培地で置換して、1

0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、HT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。

【0075】クローニングした結果、最終的に抗トリフルラリン抗体を産生している安定なハイブリドーマ1株を得た。この株をTF1B344と名付け、このハイブリドーマ株をDMEMに10%ウシ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、以下この抗体を「抗体TF1B344」という。抗体TF1B344のアイソタイプを測定したところ、IgM抗体であることが確認された。

【0076】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法によりトリフルラリンの反応性を調べた。

【0077】以下にモノクローナル抗体とトリフルラ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トリフルラリンとRSAとの結合体(250ng/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250μl/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3,000倍に希釈した溶液とトリフルラリン溶液の各々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3,000倍に希釈し、100μl/ウェルを加え、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。

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。

【0078】抗トリフルラリン抗体を用いた場合のELISA法によるコーティング抗原の濃度は250ng/mlを用い、抗体の3,000倍希釈溶液とメタノールに溶解したトリフルラリン標準ストック溶液を0.1ng/mlから100ng/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3,000倍に希釈したものをを用いることにより作成したトリフルラ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。

【0079】阻害率(%) = (標準試料の吸光度 / コントロールの吸光度) × 100

抗体TF1B344を用いたELISA法によるトリフルラリンの測定可能範囲は0.7~70ng/ml(0.7~70ppb)であり、50%阻害を示す値(IC₅₀値)は6.5ng/mlであった。

【0080】実施例4

抗体のトリフルラリン構造類似化合物に対する交差反応性

トリフルラリンと化学構造が類似している化合物について抗体TF1B344の交差反応性を調べた。交差反応性は試験化合物のIC₅₀値を求め、次式より計算した。

【0081】交差反応率(%) = (トリフルラリンの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。

【0082】

【表1】

化合物	化学構造	TF1B344	
		IC ₅₀ (ng/ml)	反応交差性 (%)
トリフルラリン		6.7	100
エタルフルラリン		8.8	99
ベネフルラリン		6.8	77
イソプロパリン		320	2.1
プロジアミン		1000	0.64
ベンジメタリン		1800	0.37

【0083】表1から次のことが判る。すなわち、抗体TF1B344は、試験した化合物のうちエタルフルラリン及びベネフルラリンに反応したが、他の化合物とは殆ど反応しなかった。この結果より、本抗体は、トリフルラリンに対して特異性の高い結合様式を示した。

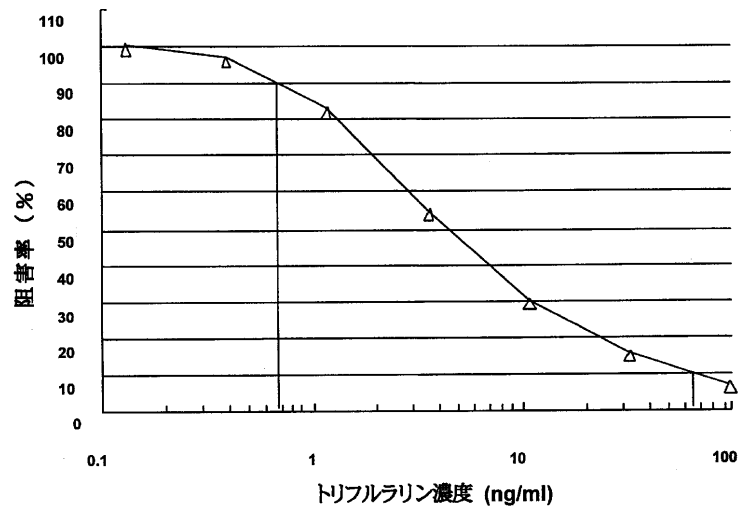
【0084】このことから、本発明のELISA法は、

土壌及び河川水中の低濃度トリフルラリンをモニタリングするのに、簡便且つ迅速な方法であることが確認された。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、間接競合ELISA法によるトリフルラリンの標準曲線である。

【図1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テ-マコード (参考)

G 0 1 N 33/577

C 1 2 N 15/00

C

// C 1 2 P 21/08

5/00

B

F タ-ム(参考) 4B024 AA05 AA11 GA03 HA15
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
 4B065 AA92X AB05 AC14 BA08
 CA25 CA46
 4H006 AA01 AB20 BJ50 BM10 BM71
 BS10 BU26 BU32 BU46
 4H045 AA11 AA30 BA50 CA40 DA76
 DA86 EA50 FA72

专利名称(译)	氟乐灵化合物，免疫反应物，杂交瘤和测量氟乐灵的方法		
公开(公告)号	JP2003166991A	公开(公告)日	2003-06-13
申请号	JP2001366162	申请日	2001-11-30
申请(专利权)人(译)	大冢化学股份有限公司		
[标]发明人	大川秀郎 森宗孝介		
发明人	大川 秀郎 森宗 孝介		
IPC分类号	G01N33/53 C07C229/18 C07K16/44 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/577		
FI分类号	G01N33/53.G C07C229/18 C07K16/44 G01N33/577.B C12P21/08 C12N15/00.C C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA05 4B024/AA11 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H006/AA01 4H006/AB20 4H006/BJ50 4H006/BM10 4H006/BM71 4H006/BS10 4H006/BU26 4H006/BU32 4H006/BU46 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA50 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA72		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的目的是提供一种新颖的三氟拉林化合物，其适用于简单，快速的方法来测量土壤，环境水例如河流等中的三氟拉林浓度。本发明的三氟拉林化合物具有通式：[在公式中，n表示1到9的整数。]表示。本发明还提供了三氟拉林化合物与载体或标记物质的缀合物，与三氟拉林具有反应性的免疫反应物等。

