(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12) **公開特許公報**（Ａ）　(11)特許出願公開番号

特開2001－352978

(P2001－352978A)

(43)公開日 平成13年12月25日(2001.12.25)

(51)Int.Cl.[7]	識別記号	ＦＩ		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ 15/02		Ｃ０７Ｋ 16/44		４Ｂ０２４
Ｃ０７Ｋ 16/44		Ｃ１２Ｐ 21/08		４Ｂ０６４
Ｃ１２Ｎ 5/10		Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｓ	４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｐ 21/08		33/577	Ｂ	４Ｈ０４５
Ｇ０１Ｎ 33/53		Ｃ１２Ｎ 15/00	Ｃ	

審査請求　未請求　請求項の数 4ＯＬ（全 10数）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2000－178363(P2000－178363)

(22)出願日　平成12年6月14日(2000.6.14)

(71)出願人　593171422
株式会社環境管理センター
東京都日野市上田129

(72)発明者　安達　俊幸
京都府京都市下京区中堂寺南町17　京都リサーチパーク　株式会社関西新技術研究所内

(72)発明者　北川　博久
京都府京都市下京区中堂寺南町17　京都リサーチパーク　株式会社関西新技術研究所内

(74)代理人　100062144
弁理士　青山　葆　（外１名）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗低塩化ビフェニルモノクローナル抗体およびそれを産生する細胞株

(57)【要約】

【課題】　免疫測定法により低塩化ビフェニル(ＬＣＢ)をモニタリングするのに適するモノクローナル抗体、該抗体を産生するハイブリドーマ細胞株、および該抗体を用いて試料中のＬＣＢを分析するための免疫測定法を提供する。さらに、該抗体を作成する際の免疫原として、あるいは、免疫測定に用いる標識化合物として有用なＬＣＢコンジュゲートを提供する。

【解決手段】　本発明者らは、ＬＣＢをリンカーを介して高分子量担体に結合させた新規なＬＣＢコンジュゲートを調製し、これを用いて哺乳動物を免疫し、細胞融合法によりハイブリドーマ細胞株を調製し、これら細胞株を適切に選択することにより、ＬＣＢの測定に適した抗ＬＣＢモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を樹立した。このモノクローナル抗体を用いてＬＣＢ測定のための免疫測定法を構築することができる。

1

【特許請求の範囲】

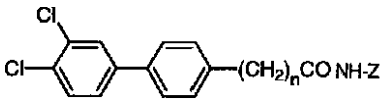
【請求項１】　ビフェニル骨格に１～３個の塩素原子を含む低塩化ビフェニルを特異的に認識するモノクローナル抗体であって、モノクローナル抗体ＣＬ-５６またはＣＬ-７０から選択されるモノクローナル抗体。

【請求項２】　請求項１記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株であって、ハイブリドーマＣＬ-５６またはＣＬ-７０から選択されるハイブリドーマ細胞株。

【請求項３】　試料中の低塩化ビフェニルを分析するための免疫測定法であって、有機溶媒を含む水溶液中で低塩化ビフェニルを含有する試料を請求項１記載のモノクローナル抗体と抗原抗体反応させ、抗体と結合した低塩化ビフェニルを検出することを特徴とする免疫測定法。

【請求項４】　以下の式で示されるコンジュゲート：

【化１】



[式中、ｎは２～６の整数であり、Ｚはキャリアータンパク質または標識物質である]。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】本発明は、ビフェニル骨格に１～３個の塩素原子を含む低塩化ビフェニル(ＬＣＢ)に高い親和性を有するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株、ならびに該モノクローナル抗体を用いて環境中に存在するＬＣＢ量を高感度に定量およびモニタリングする免疫測定法に関するものである。また、本発明は、該抗体を作成するための免疫原として、または免疫測定に用いる標識化合物として有用なコンジュゲートに関するものである。

【０００２】

【従来の技術】ＰＣＢは主に絶縁油としてトランスやコンデンサなどに使用されてきたが、その蓄積毒性が明らかとなり、現在では輸入および製造が禁止されている。これまで使用済みの絶縁油は各事業所で保管されてきたが、その分解処理技術の発達から今後は脱塩素処理が行われ、それに伴って廃棄および再利用のための処理済み油中のＰＣＢ残留量の管理が重要となる。

【０００３】ＰＣＢは、脱塩素処理すると、主にビフェニル骨格に１～３個の塩素原子を含むＬＣＢに分解される。しかし、このＬＣＢはＧＣ-ＥＣＤおよび低分解能ＧＣ-ＭＳ法では分析が困難である。また、ＬＣＢの高分解能ＧＣ-ＭＳ法による分析は、時間を要することおよび専用の施設が必要であることから、現場での対応ができないという難点がある。

【０００４】従って、脱塩素処理済み油中のＬＣＢ濃度を迅速にしかも高感度に測定するためには免疫測定法が適していると考えられる。またこの際、ポリクローナル*

2

*抗体よりも、抗原に対する特異性の高いモノクローナル抗体を用いる方が有利であると考えられる。しかし、抗ＬＣＢモノクローナル抗体による免疫測定法では以下のような技術的な課題があり、実用化に至っていない。

(１)ＬＣＢのような低分子化合物に対する抗体作成は困難である。

(２)ビフェニル骨格に１～３個の塩素原子を含むＬＣＢは、塩素の結合位置の相違により３９種類の異性体(いわゆるＰＣＢ-＃１～＃３９)から構成されており、これら構造の異なる分子の全てと交差反応するモノクローナル抗体を得ることは困難である。

(３)ビフェニル骨格に１～３個の塩素原子を含むＬＣＢは、ビフェニルと構造が似ており、これらを識別する抗体を得ることは困難である。

(４)ＬＣＢは脂溶性物質であり、抗原抗体反応を有機溶媒中で行う必要があるが、抗体はタンパク質を主成分としており、有機溶媒中では抗体活性が失われる可能性が高い。

【０００５】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上記のような技術的課題を解決し、免疫測定法によるＬＣＢの簡便かつ迅速な測定に適したモノクローナル抗体を提供することである。また本発明は、該抗体を産生するハイブリドーマ細胞株、および該抗体を使用して試料中のＬＣＢを分析するための免疫測定法を提供するものである。さらに本発明は、該抗体を作成する際の免疫原として、または免疫測定に用いる標識化合物として有用なコンジュゲートを提供するものである。

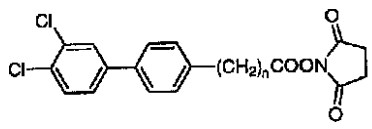
【０００６】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、目的のモノクローナル抗体を作成するために、低塩化ビフェニル(ＬＣＢ)をリンカーを介して高分子量担体に結合させて新規なコンジュゲートを調製し、このコンジュゲートを免疫原として用いて哺乳動物を免疫した。次いで、該哺乳動物の抗体産生細胞とミエローマ細胞を融合させてハイブリドーマ細胞株を調製し、これら細胞株を適切に選択することにより、ＬＣＢの測定に適した抗ＬＣＢモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を樹立した。このモノクローナル抗体を用いてＬＣＢ測定のための免疫測定法を構築することができる。

【０００７】

【発明の実施の形態】発明者らは、以下の式：

【化２】



[式中、ｎは２～６の整数である]で示されるＬＣＢの活性エステル誘導体をハプテンとしてキャリアータンパク質に結合させ、得られたコンジュゲートを免疫原として

用いて哺乳動物を免疫し、次いで細胞融合および適切なハイブリドーマ細胞株の選択を行うことにより、目的の抗ＬＣＢモノクローナル抗体が得られることを見い出した。

【０００８】上記式(化２)で示される活性エステル誘導体は、例えば次のようにして調製することができる。３,４-ジクロロアニリンをジアゾニウム塩とした後、ベンゼンとの反応により３,４-ジクロロビフェニルを合成する。この化合物をフリーデルクラフト反応でアシル化した後、メチルエステル基をカルボン酸基に加水分解する。次いで、トリフルオロ酢酸溶液中、トリエチルシランで処理することにより、５-(３,４-ジクロロビフェニル)ペンタン酸を合成する。最後に、このペンタン酸をN-ヒドロキシスクシンイミドと反応させることにより、化２で示されるＬＣＢの活性エステル誘導体が得られる。上記の反応、即ち、フリーデルクラフト反応、加水分解反応、エステル化反応などは、この分野において周知である反応条件に従って行ってよい。

【０００９】次いで、化２で示される活性エステル誘導体とキャリアータンパク質を反応させ、アミド結合を形成させることによって、上記の化１で示される一方のコンジュゲートを調製することができる。このコンジュゲートは、抗体を作成する際の免疫原として有用である。キャリアータンパク質には、牛血清アルブミン(ＢＳＡ)、ミオグロビン、キーホールリンペットヘモシアニンなどが含まれる。また、キャリアータンパク質の代わりに標識物質を、化２で示される活性エステル誘導体と反応させることによって、上記の化１で示される他方のコンジュゲートを調製することができる。このコンジュゲートは、免疫測定に用いる標識化合物として有用である。標識物質には、ビオチン、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなどが含まれる。活性エステル誘導体とキャリアータンパク質または標識物質との反応は、この分野において周知である反応条件に従って行ってよい。

【００１０】上記のようにして調製したコンジュゲートを免疫原として用いて動物を免疫する。免疫する動物としては、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ等を挙げることができる。免疫は、動物の腹腔内または肢肉趾内等にコンジュゲートを２～３週間間隔で３～４回投与することにより行う。

【００１１】最終免疫より３日後に、免疫動物から抗体産生細胞を回収する。抗体産生細胞は、脾臓細胞、リンパ節由来のＢ細胞などであってよい。この抗体産生細胞をミエローマ細胞と常法に従って融合させる。ミエローマ細胞としてはマウス、ラット、ヒトのものが挙げられる。細胞融合法としてはポリエチレングリコール法、電気的融合法、ウイルス法などが挙げられる。

【００１２】細胞融合によって得られたハイブリドーマ細胞の選択は、例えば酵素免疫測定法(ＥＩＡ)、放射性同位元素免疫測定法(ＲＩＡ)、蛍光免疫測定法(ＦＩＡ)などによって行う。即ち、固相化したＬＣＢコンジュゲートあるいはＬＣＢの活性エステル誘導体とハイブリドーマ細胞の培養上清を反応させ、抗ＬＣＢ抗体を産生しているハイブリドーマ細胞のウエルを選択し、該ウエル中のハイブリドーマ細胞を限界希釈法によってクローン化してハイブリドーマ細胞株を樹立する。

【００１３】モノクローナル抗体の調製は、例えば次のようにして行うことができる。予めプリスタンを投与したマウスの腹腔内に、樹立したハイブリドーマ細胞株を移植し、１０～１４日後にモノクローナル抗体を含む腹水を回収する。この腹水から、硫安分画、イオン交換クロマトグラフィーあるいはアフィニティークロマトグラフィー等により、モノクローナル抗体を回収および精製することができる。

【００１４】得られたモノクローナル抗体の抗原抗体反応を利用して、試料中のＬＣＢを測定することができる。このような方法には、ＥＩＡ、ＲＩＡ、ＦＩＡ等が含まれる。

【００１５】ＥＩＡは、例えば次のようにして行うことができる。抗体固相法では、ポリスチレンあるいはガラス等でできたプレート、試験管あるいはビーズ等に第１の抗体を結合させておき、これを検体と反応させる。続いて、標識化合物を結合した第２の抗体と反応させ、標識抗体の結合量を発色等で検出し定量する。抗原固相法では、予めプレート等に固相化した抗原を、検体および抗体と同時に反応させて競合反応を行い、固相化抗原に結合した抗体の量の増減を、標識化合物を結合した第２の抗体等で検出し定量する。

【００１６】ＦＩＡおよびＲＩＡでは、酵素反応を利用した発色で検出する代わりに、それぞれ蛍光色素の蛍光強度および放射性同位元素の放射活性を用いて検出する。

【００１７】ＥＩＡに使用する抗体は、ビオチン等で化学修飾して使用することができる。例えば、N-ヒドロキシスクシンイミドビオチンエステルを用いて公知の方法で容易に化学修飾することができる。この場合、化学修飾された抗体を検出するために、酵素で標識した第２の抗体の代わりに、ビオチンと特異的に結合するアビジンやストレプトアビジン等を結合させた酵素を使用する。

【００１８】ＥＩＡに使用する酵素としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、βガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ等が挙げられる。ＦＩＡに使用する蛍光化合物としては、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン等が挙げられる。ＲＩＡに使用する放射性同位元素としては、^{125}Ｉなどが挙げられる。

【００１９】抗原抗体反応は通常水溶液中で行うが、ＬＣＢの測定は、有機溶媒を含む水溶液中で行うのが適している。この場合、使用する有機溶媒は水溶性であるの

5　　6

が好ましく、このような有機溶媒には、例えばメタノール、エタノール、イソプロパノール、ｎ-プロパノール、ブタノール、アセトン、アセトニトリル、ジメチルスルホキシド(ＤＭＳＯ)などが含まれる。

【００２０】

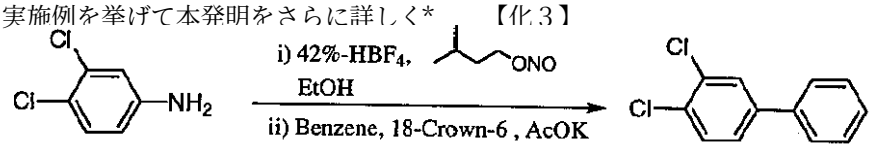
【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく*説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

【００２１】実施例１　ＬＣＢコンジュゲートの調製

(１)ＬＣＢへのスペーサー分子の導入

まず、３,４-ジクロロアニリン(化合物１)から３,４-ジクロロビフェニル(化合物２)を合成した(化３)。

【化３】

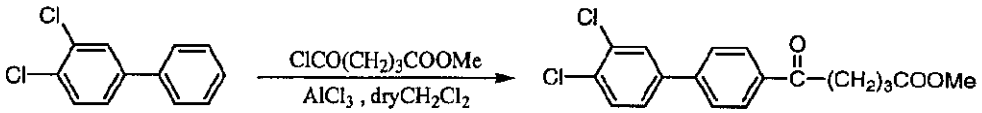


化合物１　　化合物２

【００２２】３,４-ジクロロアニリン(化合物１)およびフルオロホウ酸をエタノールに溶解し、この溶液を－５℃に冷却し、亜硝酸イソアミルを滴下した。滴下後、－５℃で２時間撹拌し、その後、エチルエーテルを加え、さらに２時間撹拌した。反応終了後、系内に沈殿したジアゾニウム塩を濾取し、エチルエーテルで洗浄し、乾燥させ、次の反応に用いた。上記の操作で得られたジアゾニウム塩および１８-クラウン-６をベンゼンに加え、撹拌した。この反応液に、無水酢酸カリウムを加え、室温*で撹拌した。反応終了後、水を加えて分液した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、溶媒を減圧下に留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、３,４-ジクロロビフェニル(化合物２)を得た。

【００２３】次に、３,４-ジクロロビフェニル(化合物２)からメチル　５-(３,４-ジクロロビフェニル-４'-イル)-５-オキソペンタノエート(化合物３)を合成した(化４)。

【化４】

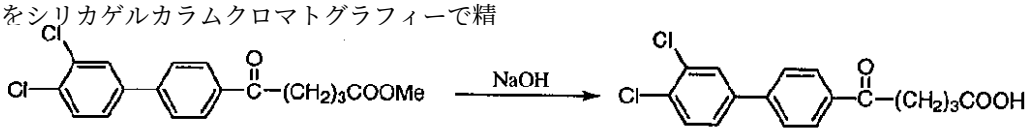


化合物２　　化合物３

【００２４】メチル　４-(クロロホルミル)ブチレートの無水ジクロロメタン溶液に氷冷下で塩化アルミニウムを加え、氷冷下で３０分間撹拌した。この反応液に、無水ジクロロメタンに溶解させた３,４-ジクロロビフェニル(化合物２)の溶液を氷冷下で滴下した後、室温に戻して１時間撹拌した。反応液を氷にあけ、ジクロロメタンで抽出し、飽和食塩水で洗浄した後、溶媒を減圧下に留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、メチル　５-(３,４-ジクロロビフェニル-４'-イル)-５-オキソペンタノエート(化合物３)を得た。

【００２５】次に、メチル　５-(３,４-ジクロロビフェニル-４'-イル)-５-オキソペンタノエート(化合物３)から５-(３,４-ジクロロビフェニル-４'-イル)-５-オキソペンタン酸(化合物４)を合成した(化５)。

【化５】

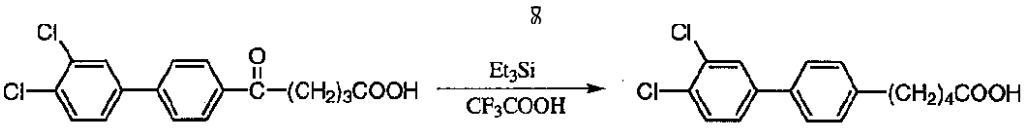


化合物３　　化合物４

【００２６】メチル　５-(３,４-ジクロロビフェニル-４'-イル)-５-オキソペンタノエート(化合物３)をジオキサンと６Ｎ塩酸の混液に溶解し、加熱還流下に５時間撹拌した。反応液を放冷後、ジクロロメタンで抽出し、飽和食塩水で洗浄した後、溶媒を減圧下に留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、得られた結晶をジクロロメタンで洗浄し、５-(３,４-ジクロロビフェニル-４'-イル)-５-オキソペンタン酸(化合物４)を得た。

【００２７】次に、５-(３,４-ジクロロビフェニル-４'-イル)-５-オキソペンタン酸(化合物４)から５-(３,４-ジクロロビフェニル)ペンタン酸(化合物５)を合成した(化６)。

【化６】

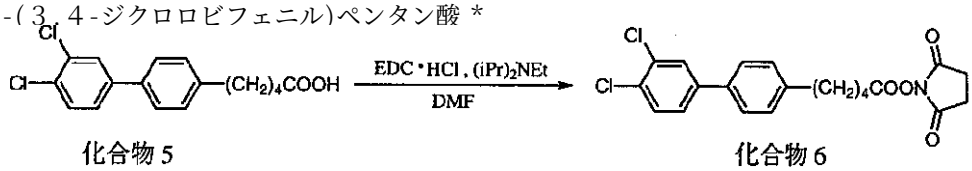


化合物４　　化合物５

【００２８】５-(３,４-ジクロロビフェニル-４'-イル)-５-オキソペンタン酸(化合物４)をトリフルオロ酢酸に溶解し、トリエチルシランを加え、室温下にて３０分間撹拌した。反応終了後、溶媒を減圧下に留去し、残渣にトルエンを加え、共沸した。残渣にジクロロメタンを加え、有機層を飽和食塩水で洗浄した後、溶媒を減圧下に留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、５-(３,４-ジクロロビフェニル)ペンタン酸*(化合物５)を得た。

【００２９】最後に、５-(３,４-ジクロロビフェニル)ペンタン酸(化合物５)からＬＣＢの活性エステル誘導体であるヒドロキシスクシンイミド-５-Ｎ-(３,４-ジクロロビフェニル)ペンタノエート(化合物６)を合成した(化７)。

【化７】



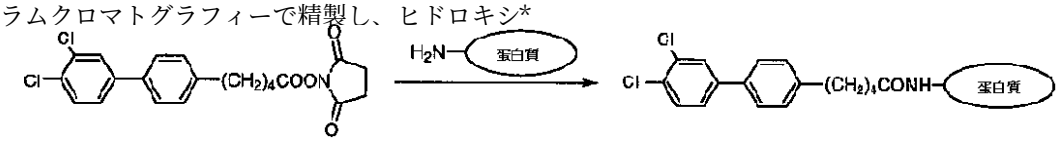
化合物５　　化合物６

【００３０】５-(３,４-ジクロロビフェニル)ペンタン酸(化合物５)、Ｎ-ヒドロキシスクシンイミドおよびＮ,Ｎ-ジイソプロピルエチルアミンを無水ジメチルホルムアミドに溶解した。次いで、１-エチル-３-(３-ジエチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩を加えた後、室温下で１５時間撹拌した。反応終了後、溶媒を減圧下に濃縮し、残渣をクロロホルムで抽出した。抽出液を１００％クエン酸、水、４％炭酸水素ナトリウムの順で洗浄した後、有機層を減圧下に濃縮乾固させた。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、ヒドロキシ*スクシンイミド-５-Ｎ-(３,４-ジクロロビフェニル)ペンタノエート(化合物６)を得た。

【００３１】(２)キャリアータンパク質とのＬＣＢコンジュゲートの調製

上記(１)で調製したＬＣＢの活性エステル誘導体とキャリアータンパク質としての牛血清アルブミン(ＢＳＡ)とを反応させて、該誘導体のスペーサーを介してＢＳＡをＬＣＢに結合させた(化８)。

【化８】



化合物６　　化合物７

【００３２】セファデックスカラムで精製したＢＳＡをリン酸緩衝液(ｐＨ８.０)に溶解した。この溶液に、ＤＭＳＯに溶解した活性エステル誘導体(化合物６)を加え、室温にて１時間反応させた後、４℃で一晩静置した。活性エステル誘導体の反応液を、ＰＢＳ(－)で平衡化したセファデックスカラムに添加し、同緩衝液で溶離して、ＬＣＢとＢＳＡとのコンジュゲート(化合物７)を精製した。

【００３３】次いで、ＢＳＡへのＬＣＢの導入率を調べた。調製したコンジュゲート(conj)およびＢＳＡの特定波長２６０ｎｍでの吸光度を測定し、以下の数式１および数式２に従って計算したところ、ＢＳＡ１分子あたりに４９分子のＬＣＢが導入されたものと推定された。

【数１】

$$\text{コンジュゲート溶液中のＬＣＢ濃度(㏖/L)} = \frac{\text{吸光度(conj)}-\text{吸光度(BSA)}}{\text{ＬＣＢのモル吸光係数}}$$

【数２】

$$\text{ＢＳＡ１分子あたりのＬＣＢ導入率} = \frac{\text{コンジュゲート溶液中のＬＣＢ濃度(㏖/L)}}{\text{コンジュゲート溶液中のＢＳＡ濃度(㏖/L)}}$$

【００３４】実施例２　抗ＬＣＢモノクローナル抗体の作成

(１)マウスの免疫

得られたＬＣＢコンジュゲートをフロインド完全アジュバント(ＦＣＡ)で乳化し、これをＢＡＬＢ／ｃマウス(７～８週齢、雌)の腹腔および後肢肉趾内に投与した。

この免疫感作の１週間後に尾静脈より採血し、ＥＬＩＳＡ法によって抗体価を測定した。次いで、ＬＣＢコンジュゲートをフロインド不完全アジュバント(ＦＩＡ)で乳化し、これを用いて追加免疫を２～３週間間隔で行い、追加免疫の１週間経過後に血中抗体価を測定し、抗体価の推移を観察した。

【００３５】(２)細胞融合

ＬＣＢに対する特異抗体の産生が確認されたマウスの尾静脈に最終免疫を行い、３日後に脾臓を摘出し、脾臓細胞を調製した。ミエローマ細胞(Ｘ６３／Ａｇ.８.６５３)と脾臓細胞を１：５になるように混合し、ポリエチレングリコール法で細胞融合を行った。ＨＡＴ(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン)を添加した１０％ＦＣＳ含有ＲＰＭＩ-１６４０培地に細胞を懸濁させ、懸濁細胞を２～５×10^5細胞／ウエルとなるように９６ウエルマイクロプレートに播種し、３７℃および５％CO_2下で培養した。

【００３６】(３)抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニング

細胞融合の１週間～１０日後にハイブリドーマの培養上清を回収し、ＬＣＢの活性エステル誘導体(化合物６)をプレートに固相化した競合ＥＬＩＳＡ法により、抗ＬＣＢ抗体の反応性を評価した。

【００３７】予め炭酸緩衝液(ｐＨ９.６)で活性化した９６ウエルＥＬＩＳＡプレート(アミノタイプ)に、１０％ＤＭＳＯ／炭酸緩衝液(ｐＨ９.６)で調製したＬＣＢの活性エステル誘導体(化合物６)の溶液を５０μｌ添加し、４℃で一晩固相化した。次いで、１％ゼラチン-ＰＢＳ(－)を各ウエルに２００μｌづつ加え、３７℃で２時間ブロッキングした。次に、ＰＣＢ-＃１２[１×10^{-4}Ｍ、２０％ＤＭＳＯ／ＰＢＳ(－)]を２５μｌ添加し、続いてハイブリドーマ培養上清を２５μｌ添加して、室温で１時間反応させた。続いて０.１％ゼラチン-ＰＢＳ(－)で希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスＩｇＧ(γ鎖認識)抗体の溶液５０μｌを加え、室温で１時間反応させた。ＴＭＢ基質溶液５０μｌを加え、室温で発色させ、同容量の２Ｍ H_3PO_4を添加して反応を停止させ、測定波長：４５０ｎｍ、対照波長：６５５ｎｍにおける吸光度をＥＬＩＳＡリーダーにて測定した。一連の操作における各反応終了時には、０.００５％のツイーン(Tween)２０を含有するＰＢＳ(－)にて各ウエルを十分に洗浄し、未反応の試薬を除去した。標準ＰＣＢの非存在下[２０％ＤＭＳＯ／ＰＢＳ(－)、２５μｌ]での吸光度を１００％とし、標準ＰＣＢの存在下での酵素反応による発色を阻害する程度が高いウエルを特異的な抗体産生ウエルとした。

【００３８】スクリーニング陽性ウエルのコロニー状細胞をピペッティングしてほぐし、マウス脾臓細胞の懸濁液(フィーダー細胞)で希釈し、９６ウエル培養プレートに分注し、３７℃および５％CO_2下で培養した。上記の方法により抗ＬＣＢモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、２クローン樹立した(ハイブリドーマＣＬ-５６およびＣＬ-７０と命名)。これらのクローンは、平成１２年４月２１日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託され、受託番号としてＦＥＲＭ Ｐ-１７８２４およびＦＥＲＭ Ｐ-１７８２５を取得している。

【００３９】(４)抗体のアイソタイプ分析

ＬＣＢの活性エステル誘導体(化合物６)を固相化したＥＬＩＳＡプレートを用い、マウスタイパーキット(Bio-Rad社)を用いて２種類のモノクローナル抗体を評価した結果、２種類の抗体は全てＩｇＧ１(λ)であった。

【００４０】(５)モノクローナル抗体の大量調製と精製

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を、マウス腹腔内に５×10^6～１×10^7細胞／マウスで移植し、約２～４週間後にマウス１匹あたり約３～１０ｍｌの腹水を回収した。得られたマウス腹水を、プロテインＧセファロースカラムによりアフィニティー精製し、腹水１ｍｌあたり約１～２ｍｇのＩｇＧを回収した。

【００４１】実施例３　ＬＣＢ異性体との交差反応性

予め０.０５M炭酸緩衝液(ｐＨ９.６)で活性化した９６ウエルＥＬＩＳＡプレート(アミノタイプ)に、１０％ＤＭＳＯ／炭酸緩衝液(ｐＨ９.６)で調製したＬＣＢの活性エステル誘導体(化合物６)の溶液を５０μｌ添加し、４℃で一晩固相化した。次いで、１％ゼラチン-ＰＢＳ(－)を各ウエルに２００μｌづつ加え、３７℃で２時間ブロッキングした。次に、標準ＰＣＢ[２０％ＤＭＳＯ／ＰＢＳ(－)]を２５μｌ添加し、続いて精製したモノクローナル抗体を添加して、室温で１時間反応させた。続いて０.１％ゼラチン-ＰＢＳ(－)で希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスＩｇＧ(Ｈ＋Ｌ鎖認識)抗体の溶液５０μｌを加え、室温で１時間反応させた。ＴＭＢ基質溶液５０μｌを加え、室温で発色させ、同容量の２MH $_3PO_4$を添加して反応を停止させ、測定波長：４５０ｎｍ、対照波長：６５５ｎｍにおける吸光度をＥＬＩＳＡリーダーにて測定した。一連の操作における各反応終了時には、０.００５％ツイーン２０含有ＰＢＳ(－)にて各ウエルを十分に洗浄し、未反応の試薬を除去した。

【００４２】それぞれのＬＣＢを用いて作成した阻害曲線から、各ＬＣＢ(５×10^{-4}Ｍ～２×10^{-5}Ｍ)と抗体との反応性を検討した。その結果、ＣＬ-５６抗体は、１および２塩化ビフェニルの１５種類の異性体(ＰＣＢ-＃１～＃１５)のうち９種類の異性体との反応性を示し(表１)、ＣＬ-７０抗体は、３塩化ビフェニルの２４種類の異性体(ＰＣＢ-＃１６～＃３９)のうち１０種類の異性体との反応性を示した(表２)。また、ＣＬ-５６抗体はビフェニルと低反応性で反応したが、ＣＬ-７０抗体はビフェニルとは反応しなかった。従って、ＣＬ-５６抗体は、それが１および２塩化ビフェニルの６０％と反応することから、１および２塩化ビフェニルの分析に

利用できる可能性が示唆された。また、ＣＬ-７０抗体　　*た。
は、それが主に３塩化ビフェニルと反応することから、　　【００４３】
３塩化ビフェニルの分析に利用できる可能性が示唆され*　　【表１】

	ＣＬ-５６阻害率（%）			
	2×10^{-5}M	5×10^{-5}M	1×10^{-4}M	5×10^{-4}M
＃１				
＃２	10.00	8.33	10.33	18.00
＃３				
＃４				
＃５	15.67	18.67	22.33	30.00
＃６	17.67	25.00	35.67	61.67
＃７	11.33	14.67	20.33	44.00
＃８	12.33	13.33	14.00	23.67
＃９				
＃１０				
＃１１	11.67	15.67	24.33	59.33
＃１２	14.33	20.00	30.00	63.67
＃１３	17.00	32.67	51.00	83.33
＃１４				
＃１５	18.67	34.33	39.00	41.67
ビフェニル	11.00	11.67	13.67	17.00

(空欄は反応しないことを示す)

【００４４】　　【表２】

14

	ＣＬ-７０阻害率（%）			
	2×10^{-5}M	5×10^{-5}M	1×10^{-4}M	5×10^{-4}M
＃１６				
＃１７				
＃１８				
＃１９				
＃２０				
＃２１	10.00	10.67	11.67	19.33
＃２２				
＃２３				
＃２４				
＃２５	12.33	22.75	29.50	44.50
＃２６				
＃２７				
＃２８	14.67	20.50	23.50	35.00
＃２９				
＃３０				
＃３１				
＃３２				
＃３３	14.00	31.25	43.75	55.75
＃３４	17.67	22.00	26.67	35.33
＃３５	40.00	61.67	75.33	85.67
＃３６	15.67	20.67	26.00	38.67
＃３７	31.00	54.00	71.67	90.67
＃３８	15.33	31.00	49.33	72.67
＃３９	24.33	45.00	67.33	87.00
ビフェニル	10.00	10.00	10.00	8.67

（空欄は反応しないことを示す）

【００４５】ＣＬ-５６およびＣＬ-７０抗体とそれぞれ最も強く反応するＰＣＢ-＃１３および＃３７を標準品として選択し、それぞれの抗体を用いた場合のＬＣＢ量(添加未標識体)-反応曲線を作成した(図１および図２)。その結果、いずれも濃度依存的な反応性が見られ、ＰＣＢ-＃１３および＃３７を標準物質とする測定系が構築された。

【００４６】実施例４　ＬＣＢ混合物の測定

脱塩素処理を行ったトランス油中には、主に１塩化ビフェニルと２塩化ビフェニルが含まれる。特にＣＬ-５６抗体は、１および２塩化ビフェニルの分析に利用できる可能性が示唆されたことから、ＬＣＢ異性体の混合物を試料として用い、ＣＬ-５６抗体を用いたＬＣＢの定量を検討した。１および２塩化ビフェニルの全１５異性体をモル換算で等量ずつ混合した混合試料(１５ＭＩＸ)、ならびに、１および２塩化ビフェニルの１５異性体のうちＣＬ-５６抗体との反応性の高い６種類の異性体(ＰＣＢ-＃５、ＰＣＢ-＃６、ＰＣＢ-＃７、ＰＣＢ-＃１２、ＰＣＢ-＃１３、ＰＣＢ-＃１５)を同様に混合した混合試料(６ＭＩＸ)を調製し、それぞれの試料の阻害曲線を作成した(図３および図４)。その結果、いずれの試料においても濃度依存的な反応性が見られ、ＣＬ-５６抗体によるＬＣＢの定量の可能性が示唆された。

【００４７】それぞれの測定はｎ＝３で行い、検出限界はベースライン値の±２ＳＤで示した。これらの結果を、ＰＣＢ-＃１３単独の試料(図１)で得られた結果と共に、以下の表３に示す。

【表３】

16

	検出限界 ＊
ＰＣＢ-＃１３単独	５.２ｐｐｍ
１５ＭＩＸ	７.９ｐｐｍ
６ＭＩＸ	３.０ｐｐｍ

＊阻害曲線のベースラインに２ＳＤを加えた値に対するＬＣＢ

【００４８】

【発明の効果】本発明により、ＬＣＢと特異的に反応するモノクローナル抗体が提供された。これらのモノクローナル抗体を利用することにより、高感度で迅速なＬＣＢの免疫測定法を構築することができる。この測定法を、例えば以下の目的に使用することができる。

(１)ＰＣＢトランス油を脱塩素処理したときの処理油中に含まれる総ＬＣＢのモニタリング

(２)ＰＣＢトランス油を脱塩素処理したときの分解率のモニタリング

(３)産業廃棄物中に含まれるＬＣＢのモニタリング

*(４)生物中に蓄積されたＬＣＢのモニタリング

【図面の簡単な説明】

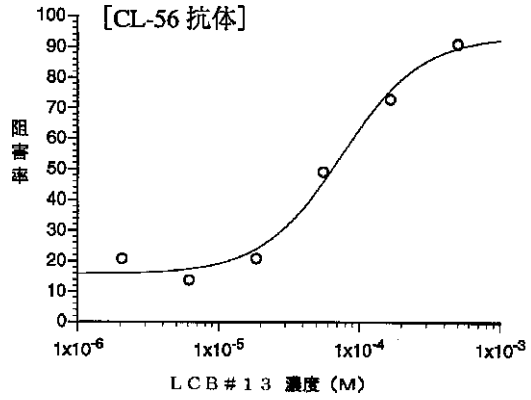
【図１】　ＣＬ-５６抗体を用いたときの標準ＰＣＢ-＃１３濃度と阻害率の関係を示すグラフである。

【図２】　ＣＬ-７０抗体を用いたときの標準ＰＣＢ-＃３７濃度と阻害率の関係を示すグラフである。

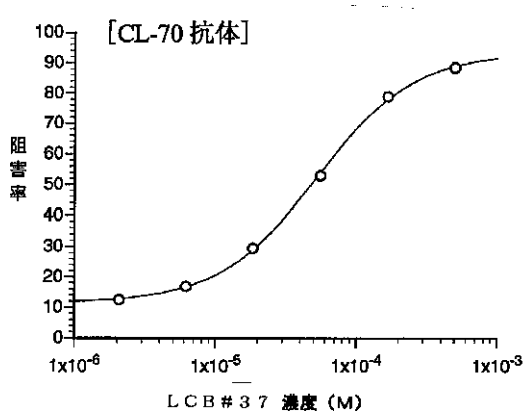
【図３】　ＣＬ-５６抗体を用いたときのＬＣＢ混合試料(１５ＭＩＸ)濃度と阻害率の関係を示すグラフである。

【図４】　ＣＬ-５６抗体を用いたときのＬＣＢ混合試料(６ＭＩＸ)濃度と阻害率の関係を示すグラフである。

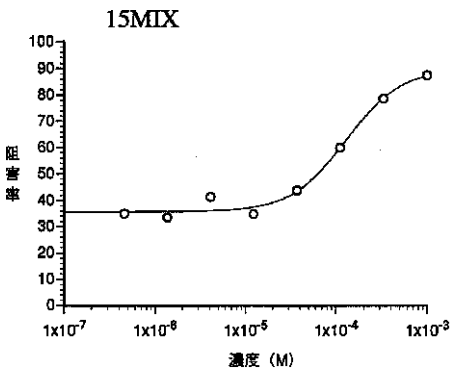
【図１】



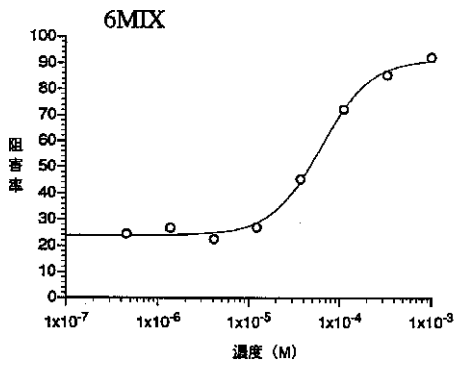
【図２】



【図３】



【図４】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	識別記号	ＦＩ	ﾃｰﾏｺｰﾄﾞ(参考)
Ｇ０１Ｎ　33/577		Ｃ１２Ｎ　5/00	Ｂ

(72)発明者　片岡　千和
京都府京都市下京区中堂寺南町17　京都リサーチパーク　株式会社関西新技術研究所内

(72)発明者　高木　陽子
京都府京都市下京区中堂寺南町17　京都リサーチパーク　株式会社関西新技術研究所内

Ｆターム(参考)　4B024 AA11 BA53 GA03 GA18 HA15
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
4B065 AA92X AB05 AC14 BA08
CA25 CA46
4H045 AA11 AA30 BA42 BA72 CA40
DA76 DA86 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	抗低氯化物联苯单克隆抗体和产生它们的细胞系		
公开(公告)号	JP2001352978A	公开(公告)日	2001-12-25
申请号	JP2000178363	申请日	2000-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	环境控制中心		
申请(专利权)人(译)	有限公司环境管理中心		
[标]发明人	安達俊幸 北川博久 片岡千和 高木陽子		
发明人	安達 俊幸 北川 博久 片岡 千和 高木 陽子		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/44 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/44 C12P21/08 G01N33/53.S G01N33/577.B C12N15/00.C C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/GA03 4B024/GA18 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA42 4H045/BA72 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种适于通过免疫测定，产生该抗体的杂交瘤细胞系以及使用该抗体分析样品中的LCB的免疫测定来监测低氯联苯（LCB）的单克隆抗体。 提供。 此外，提供了一种LCB缀合物，其在产生抗体时用作免疫原或在免疫测定中用作标记化合物。 本发明人制备了新型LCB缀合物，其中LCB通过连接子与高分子量载体结合，用LCB缀合物免疫哺乳动物，并通过细胞融合方法制备杂交瘤细胞系。 通过制备和适当选择这些细胞系，建立了产生适于LCB测量的抗LCB单克隆抗体的杂交瘤细胞系。 可以使用该单克隆抗体构建用于LCB测量的免疫测定法。