

(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 - 243738

(P2002 - 243738A)

(43)公開日 平成14年8月28日(2002.8.28)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	S 4 H 0 0 6
C 0 7 C 59/68		C 0 7 C 59/68	
G 0 1 N 33/543	511	G 0 1 N 33/543	511 D
33/547		33/547	

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 10数)

(21)出願番号 特願2001 - 73922(P2001 - 73922)

(22)出願日 平成13年3月15日(2001.3.15)

(31)優先権主張番号 特願2000 - 376083(P2000 - 376083)

(32)優先日 平成12年12月11日(2000.12.11)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(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)

Fターム(参考) 4H006 AA01 AA03 AB20 BJ50 BP30

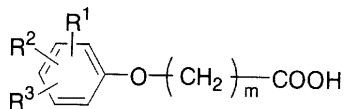
(54)【発明の名称】 有機塩素化合物の測定法

(57)【要約】

【課題】 従来の煩雑な測定法に替わるPCB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】

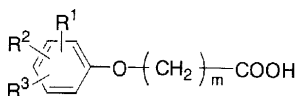


(式中、R¹およびR²は低級アルキル基、R³は水素原子または低級アルキル基であり、mは5ないし7の整数である。)で表されるカルボン酸を固相結合抗原または標識抗原の抗原として用いることにより、免疫測定法により有機塩素化合物を測定することができる。

【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、固相結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、R¹およびR²は低級アルキル基、R³は水素原子または低級アルキル基であり、mは5ないし7の整数である。）。

【請求項2】 mが5である請求項1に記載の方法。

【請求項3】 R¹およびR²がメチル基、R³が水素原子である請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 R¹、R²およびR³がメチル基である請求項1または2に記載の方法。

【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。

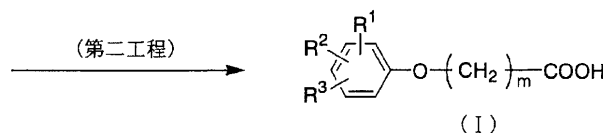
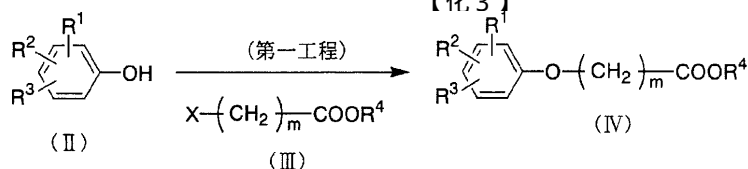
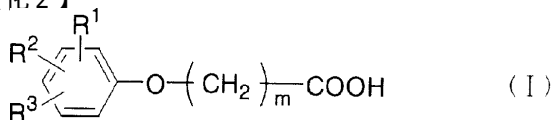
【請求項9】 請求項1ないし8のいずれかに記載の免疫測定方法を実施するための免疫測定キット。

【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2】



（式中、R¹およびR²は低級アルキル基、R³は水素原子または低級アルキル基であり、mは5ないし7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】

【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免疫測定方法を提供することが目的である。また、固相抗原または標識抗原として、PCBまたはダイオキシン類そのものでなく、比較的毒性の低い化合物を用いることにより、より安全性の高い免疫測定方法を提供するものである。さらに、本発明は、一度に広範な有機塩素化合物を測定する免疫測定方法を提供するものである。

【0004】

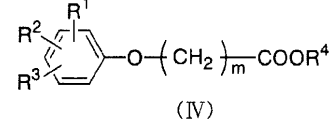
【課題を解決するための手段】かかる課題を解決するため本発明者らは、新規な前記一般式（I）で表されるカルボン酸を見出し、さらに、該カルボン酸を用いるとPCBやダイオキシン類などの有機塩素化合物を免疫測定法により広汎に測定できることを見出して、本発明を完成した。

【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3】



【0007】(式中、 R^1 および R^2 は低級アルキル基、 R^3 は水素原子または低級アルキル基、 R^4 はアルキル基またはアリール基、 m は5ないし7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ができる。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」としては、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、 n -ナフチル、 n -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)で表される置換フェノールと一般式(III)で表されるハロ脂肪酸エステルとを塩基の存在下、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)で表される置換フェノールとしては、たとえば、ジメチルフェノール、トリメチ

ルフェノール、ジエチルフェノール、トリエチルフェノール、エチルメチルフェノール、エチルジメチルフェノール、ジエチルメチルフェノール等を挙げることができる。また、一般式(III)で表されるハロ脂肪酸エステルとしては、たとえば、6-プロモヘキサン酸エチル、6-プロモヘキサン酸メチル、6-プロモヘキサン酸 t -ブチル、7-プロモヘプタン酸エチル、7-プロモヘプタン酸メチル、7-プロモヘプタン酸 t -ブチル、8-プロモオクタン酸エチル、8-プロモオクタン酸メチル、8-プロモオクタン酸 t -ブチル、6-クロロヘキサン酸エチル、6-クロロヘキサン酸メチル、6-クロロヘキサン酸 t -ブチル、7-クロロヘプタン酸エチル、7-クロロヘプタン酸メチル、7-クロロヘプタン酸 t -ブチル、8-クロロオクタン酸エチル、8-クロロオクタン酸メチル、8-クロロオクタン酸 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。

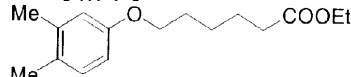
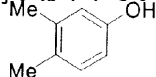
【0011】本発明は、前記一般式(I)で表されるカルボン酸を用いて、免疫測定方法により有機塩素化合物を測定するものである。本発明の競合反応法は、測定対象物質である有機塩素化合物を認識する抗体と、検体中の有機塩素化合物と、試薬として用いる前記一般式(I)で表されるカルボン酸とを競合させることを基本原理とする免疫測定方法であり、固相结合抗原を用いる方法と固相结合抗体を用いる方法との2通りがある。すなわち、固相に結合した該カルボン酸と標識抗体と検体とを競合反応させ、固相に結合した標識抗体量に基づく応答を測定したり、固相结合抗体と標識された該カルボン酸と検体とを競合反応させ、固相に結合した標識抗原(標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に適宜もちいることができる。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シスクシンイミド

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-Carbonyldiimidazole)などを挙げるができる。

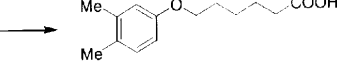
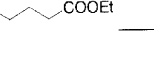
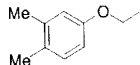
【0013】本発明の免疫測定に用いる標識物質は、標識物質を検出する応答を与える物質であり、例えば、酵素、放射性同位元素、蛍光物質、発光物質等が挙げられるが、酵素を採用することが好ましい。酵素標識抗体の酵素としては、測定系により影響のない酵素、例えば、アルカリフォスファターゼ等を使用できる。

【0014】本発明に使用するキャリアープロテインと*



【0018】3,4-ジメチルフェノール366mg (3.0mmol)の無水ジメチルホルムアミド溶液(10ml)に炭酸カリウム455mg (3.3mmol)、6-プロモヘキサン酸エチル669mg (3.0mmol)を加え、室温で24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、50%炭酸カリウム水溶液、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-酢酸エチル=50:1)で精製し、6-(3,4-ジメチルフェノキシ)ヘキサン酸エチル475mg (収率60.0%)を得た。

【0019】¹H-NMR(400MHz, CDCl₃): 1.26(t, J=7.1Hz, 3H), 1.44~1.54(m, 2H), 1.65~1.74(m, 2H), 1.74~1.82(m, 2H), 2.*



【0022】6-(3,4-ジメチルフェノキシ)ヘキサン酸エチル313mg (1.18mmol)をエタノール5mlに溶解し、4N水酸化リチウム水溶液1ml(4.0mmol)を加え、室温で14時間撹拌した。反応終了後、反応液を減圧下濃縮し10%クエン酸で酸性とした。析出した結晶を濾取し、精製水、ヘキサンにて洗浄後減圧下乾燥し、6-(3,4-ジメチルフェノキシ)ヘキサン酸274mg (収率98.8%)を得た。

【0023】mp: 105.0~106.5

¹H-NMR(400MHz, CDCl₃): 1.48~1.57(m, 2H), 1.67~1.83(m, 4H), 2.19(s, 3H), 2.23(s, 3

*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。

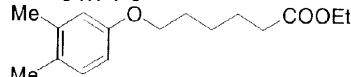
【0015】

【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-ジメチルフェノキシ)ヘキサン酸エチルの合成

【0017】

【化4】



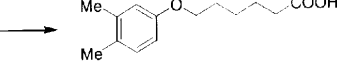
*1.8(s, 3H), 2.23(s, 3H), 2.33(t, J=7.5Hz, 2H), 3.92(t, J=6.5Hz, 2H), 4.13(q, J=7.1Hz, 2H), 6.63(dd, J=8.2 and 2.7Hz, 1H), 6.70(d, J=2.7Hz, 1H), 7.01(d, J=8.2Hz, 1H) ppm.

IR(liquid film): 2944, 1740, 1612, 1306, 1256, 1166 cm⁻¹
Mass(m/z, %): 264(M⁺, 44), 143(83), 122(100), 97(34), 69(36).

【0020】参考例2 6-(3,4-ジメチルフェノキシ)ヘキサン酸の合成

【0021】

【化5】



H), 2.39(t, J=7.4Hz, 2H), 3.93(t, J=6.4Hz, 2H), 6.63(dd, J=8.2 and 2.7Hz, 1H), 6.70(d, J=2.7Hz, 1H), 7.01(d, J=8.2Hz, 1H) ppm.

IR(KBr): 3050, 2948, 1716, 1616, 1506, 1254, 1206, 1124, 1020 cm⁻¹

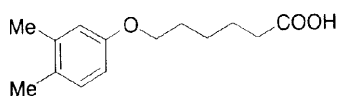
Mass(m/z, %): 236(M⁺, 72), 122(100), 107(51).

【0024】参考例3 N-スクシンイミジル-6-(3,4-ジメチルフェノキシ)ヘキサノエートの合成

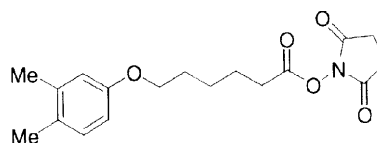
【0025】

7

【化6】



8



【0026】6-(3,4-ジメチルフェノキシ)ヘキサン酸1.04g(4.42mmol)の無水ジクロロメタン溶液(20ml)にN-ヒドロキシスクシンイミド560mg(4.86mmol)、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932mg(4.86mmol)を加え、室温で3日間撹拌した。反応終了後、10%クエン酸水溶液を加え、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ー(ヘキサン-酢酸エチル=1:1)で精製し、エーテル-ヘキサン-酢酸エチルから再結晶し、N-スクシンイミジル-6-(3,4-ジメチルフェノキシ)ヘキサノエート1.28g(収率87.0%)を得た。

【0027】mp:84.0~85.0

¹H-NMR(400MHz,CDCl₃): 1.55~1.64(m,2H),1.77~1.87(m,4H),2.19(s,3H),2.23(s,3H),2.65(t,J=7.5Hz,2H),2.84(bs,4H),3.94(t,J=6.3Hz,2H),6.64(dd,J=8.2and2.7Hz,1H),6.71(d,J=2.7Hz,1H),7.01(d,J=8.2Hz,1H)ppm.

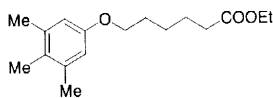
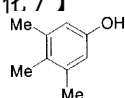
IR(KBr):2952,1812,1784,1740,1622,1506,1202,1066cm⁻¹

Mass(m/z,%):333(M⁺,73),219(48),122(100),97(36),69(28).

【0028】参考例4 6-(3,4,5-トリメチルフェノキシ)ヘキサン酸エチルの合成

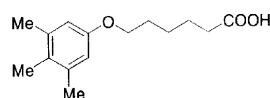
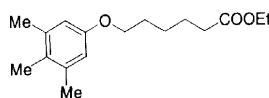
【0029】

【化7】



*

40



【0034】6-(3,4,5-トリメチルフェノキシ)ヘキサン酸エチル792mg(2.84mmol)をエタノール10mlに溶解し、4N水酸化リチウム水溶液2.13ml(8.53mmol)を加え、60で2.5時間撹拌した。反応終了後、反応液を減圧下濃

*【0030】アルゴン気流下、3,4,5-トリメチルフェノール681mg(5.0mmol)の無水ジメチルホルムアミド溶液(15ml)に60%油性水素化ナトリウム200mg(5.0mmol)を加え、室温で15分間撹拌した。続いて6-プロモヘキサン酸エチル1.34g(5.1mmol)を加え、室温で18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-酢酸エチル=15:1)で精製し、6-(3,4,5-トリメチルフェノキシ)ヘキサン酸エチル1.23g(収率88.2%)を得た。

【0031】¹H-NMR(400MHz,CDCl₃): 1.25(t,J=7.1Hz,3H),1.44~1.53(m,2H),1.65~1.73(m,2H),1.74~1.81(m,2H),2.09(s,3H),2.25(s,6H),2.32(t,J=7.5Hz,2H),3.91(t,J=6.4Hz,2H),4.13(q,J=7.1Hz,2H),6.57(s,2H)ppm.

IR(liquid film):2952,1740,1608,1490,1318,1202,1148,1060cm⁻¹

Mass(m/z,%):278(M⁺,46),143(96),136(100),121(43),97(35),69(36).

【0032】参考例5 6-(3,4,5-トリメチルフェノキシ)ヘキサン酸の合成

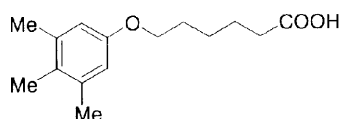
【0033】

【化8】

縮し10%クエン酸で酸性とした。析出した結晶を濾取し、エーテル-ヘキサンから再結晶し6-(3,4,5-トリメチルフェノキシ)ヘキサン酸561mg(収率78.7%)を得た。

【0035】mp:77.0~78.0

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 1.48 ~ 1.57 (m, 2H), 1.67 ~ 1.75 (m, 2H), 1.75 ~ 1.82 (m, 2H), 2.09 (s, 3H), 2.25 (s, 6H), 2.39 (t, $J=7.5$ Hz, 2H), 3.92 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 6.57 (s, 2H) ppm.
 IR (KBr): 3044, 2932, 1712, 1606, 1490, 1322, 1230, 1150, 10



【0038】6-(3,4,5-トリメチルフェノキシ)ヘキサノ酸 375 mg (1.5 mmol) の無水ジクロロメタン溶液 (10 ml) に N-ヒドロキシスクシンイミド 207 mg (1.8 mmol) 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 345 mg (1.8 mmol) を加え、室温で 18 時間 20 攪拌した。反応終了後、10%クエン酸水溶液を加え、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。エーテル-酢酸エチル-ヘキサノ酸から再結晶し N-スクシンイミジル-6-(3,4,5-トリメチルフェノキシ)ヘキサノエート 402 mg (収率 77.2%) を得た。

【0039】mp: 91.5 ~ 92.0
 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 1.50 ~ 1.63 (m, 2H), 1.76 ~ 1.87 (m, 4H), 2.09 (s, 3H), 2.25 (s, 6 30 H), 2.64 (t, $J=7.5$ Hz, 2H), 2.84 (bs, 4H), 3.93 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 6.57 (s, 2H) ppm.

IR (KBr): 2944, 1822, 1784, 1756, 1604, 1318, 1218, 1148, 1080 cm^{-1}

Mass (m/z, %): 347 (M^+ , 77), 233 (45), 136 (100), 121 (26), 97 (26), 69 (21).

【0040】参考例 7 3,4-ジメチルフェノキシヘキサノ酸結合 BSA の合成
 ウシ血清アルブミン (BSA) 5.0 mg を 0.1 M のリン酸緩衝液 (pH 7.5) 900 μl に溶解し、N-スクシンイミジル-6-(3,4-ジメチルフェノキシ)ヘキサノエート 1.0 mg の無水ジメチルホルムアミド溶液 100 μl を加え、室温で 5 時間攪拌した。その後反応液を PBS 中で透析し脱塩して、標記 3,4-ジメチルフェノキシヘキサノ酸結合 BSA を得た。

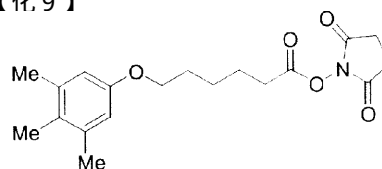
【0041】参考例 8 3,4-ジメチルフェノキシヘ

60 cm^{-1}
 Mass (m/z, %): 250 (M^+ , 41), 136 (100), 121 (28).

【0036】参考例 6 N-スクシンイミジル-6-(3,4,5-トリメチルフェノキシ)ヘキサノエートの合成

【0037】

【化 9】



キサノ酸結合 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 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 5.0) にて 3 回洗浄し、同緩衝液 1 ml にて懸濁後、50 ~ 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整した参考例 7 で作成した 3,4-ジメチルフェノキシヘキサノ酸結合 BSA 溶液 1 ml 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、0.05 M メス緩衝液 (pH 5.5) 1 ml に懸濁し、80 mg/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 50 μl 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 2 ml 添加しローテーターで 37 一晚回転反応させた。粒子を洗浄後、粒子濃度を 1.5% に合わせて 3,4-ジメチルフェノキシヘキサノ酸結合 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 # 126 (3,3',4,4',5-ペンタクロロビフェニル) 抗体の作成

抗 PCB # 126 モノクローナル抗体 (PCB 77A 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 # 126 抗体を得た。

【0043】実施例 1 PCB # 126 の測定

PCB # 126 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 1 ステップ競合法にて行った。参考例 8 で作成した 3,4-ジメチルフェノキシヘキサノ酸結合 BSA 感作粒子 150 μl に PCB # 126 の標準抗原液 90 μl と ALP 標識抗 PCB # 126 抗体液 50 μl を加え、37 20 分間免疫反応を行い、洗浄後基質 (AMP PD) 液 200 μl 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 # 126 の標準抗原液は、PCB # 126 (ジーエルサイエンス社製) を 10% ジメチルホルムホキシド溶液に溶解し、0 ~ 10 ng/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】また、3,4-ジメチルフェノキシヘキサン酸結合BSA感作粒子を用いたPCB#126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;TEF0.1以上)ダイオキシン11種との交叉反応性の測定結果を表1および表2に示す。その結果、PCB#126測定系では、PCB#77と14.3%、PCB#81と5.2%、PCB#156と7.7%、1,2,3,4,7,8-HeCDDと20.9%の交叉反応性を示した。

【0046】参考例10 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。

【0047】実施例2 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1ステップ競合法にて行った。参考例8で作成した3,4-ジメチルフェノキシヘキサン酸結合BSA感作粒子150μlにPCB#169の標準抗原液90μlとALP標識抗PCB#169抗体液50μlを加え、37℃20分間免疫反応を行い、洗浄後基質(AMPD)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。

【0048】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、0~10ng/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2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。

【0049】また、3,4-ジメチルフェノキシヘキサン酸結合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;TEF0.1以上)ダイオキシン11種との交叉反応性の測定結果を表1および表2に示す。その結果、PCB#169測定系では、PCB#126と91.2%、2,3,4,7,8-PeCDDと91.9%の非常に高い交叉反応性を、また、その他の同族体とも多数交叉反応性を示した。

【0050】参考例11 3,4,5-トリメチルフェノキシヘキサン酸結合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)900μlに溶解し、N-スクシンイミジル-6-(3,4,5-トリメチルフェノキシ)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3,4,5-トリメチルフェノキシヘキサン酸結合BSAを得た。

【0051】参考例12 3,4,5-トリメチルフェノキシヘキサン酸結合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11で作成した3,4,5-トリメチルフェノキシヘキサン酸結合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)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3,4,5-トリメチルフェノキシヘキサン酸結合BSA感作粒子を得た。

【0052】実施例3 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Delay1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12で作成した3,4,5-トリメチルフェノキシヘキサン酸結合BSA感作粒子150μlとを、37℃10分間免疫反応させた。洗浄後、基質(AMPD)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。

【0053】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3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。

【0054】また、3,4,5-トリメチルフェノキシヘキサン酸結合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;TEF0.1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、PC * 【0055】
B及びダイオキシンの同族体と多数交叉反応性を示し 【表1】
た。

各測定系の測定感度

(ng/ml)

B/B0	3,4-ジメチルフェノキシ ヘキサン酸結合 BSA	3,4-ジメチルフェノキシ ヘキサン酸結合 BSA	3,4,5-トリメチルフェノキシ ヘキサン酸結合 BSA
	PCB#126系(1step法)	PCB#169系(1step法)	PCB#169系(Delay1Step法)
90%	0.36	0.29	0.09
85%	0.52	0.42	0.12
50%	2.45	1.97	0.53

【0056】

PCB同族体の交叉反応性

* * 【表2】

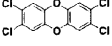
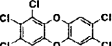
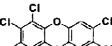
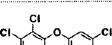
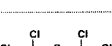
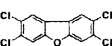
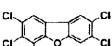
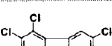
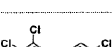

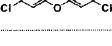
測定対象物	3,4-ジメチルフェノキシ ヘキサン酸結合 BSA	3,4-ジメチルフェノキシ ヘキサン酸結合 BSA	3,4,5-トリメチルフェノキシ ヘキサン酸結合 BSA
	PCB#126系	PCB#169系	PCB#169系
3,3',4,4'-TCB(77)	14.3	13.4	2.9
3,4,4',5-TCB(81)	5.2	3.3	1.7
3,3',4,4',5-PeCB(126)	/	91.2	22.5
2,3,3',4,4',5-HxCB(156)	7.7	—	—
3,3',4,4',5,5'-HxCB(169)	—	/	/

* 50%阻害率の濃度の割合から求めた(単位%)。

【0057】

【表3】

16
PCB測定系に対するDioxinの交叉反応性

測定対象物	3,4-ジメチルフェノキシ ヘキサン酸結合BSA	3,4-ジメチルフェノキシ ヘキサン酸結合BSA	3,4,5-トリメチルフェノキシ ヘキサン酸結合BSA
	PCB#126系	PCB#169系	PCB#169系
2,3,7,8-TCDD 	—	3.4	—
1,2,3,7,8-PeDD 	—	28.6	18.3
1,2,3,4,7,8-HeCDD 	20.9	—	—
1,2,3,6,7,8-HeCDD 	—	11.9	25.9
1,2,3,7,8,9-HeCDD 	—	—	—
2,3,7,8-TCDF 	—	7.7	—
2,3,4,7,8-PeCDF 	—	91.9	41.1
1,2,3,4,7,8-HeCDF 	—	—	—
1,2,3,6,7,8-HeCDF 	—	3.1	5.9
1,2,3,7,8,9-HeCDF 	—	—	—
2,3,4,6,7,8-HeCDF 	—	18.1	16.0

* 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、固相抗原または標識抗原として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やダイオキシンそのものではないため、より安全性の高い測定法を提供することができる。さらに本発明は、PCBおよびダイオキシン類と多数交叉反応性を示すため、一度に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】

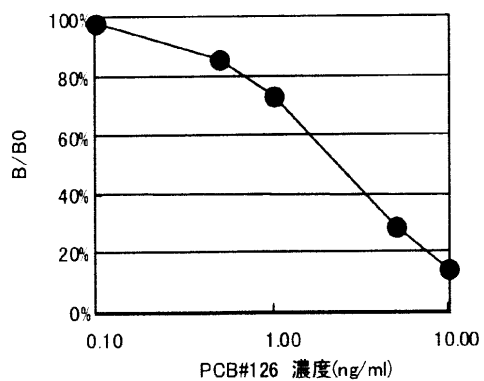
【図1】3,4-ジメチルフェノキシヘキサン酸結合BSAと、ALP#126抗体を用いてPCB#126を測定したときの標準曲線を示す。

【図2】3,4-ジメチルフェノキシヘキサン酸結合BSAと、ALP#169抗体を用いてPCB#169を測定したときの標準曲線を示す。

【図3】3,4,5-トリメチルフェノキシヘキサン酸結合BSAと、ALP#169抗体を用いてPCB#169を測定したときの標準曲線を示す。

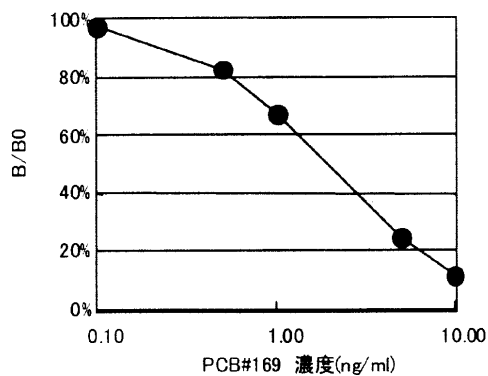
【図1】

PCB#126 STD Assay



【図2】

PCB#169 STD Assay

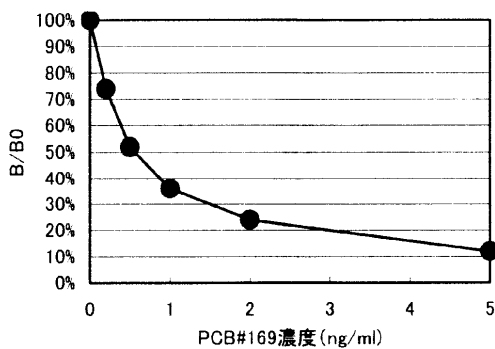


3,4-ジメチルフェノキシヘキサン酸結合 BSA と、
ALP 標識抗 PCB#126 抗体を用いた PCB#126 の STD Assay

3,4-ジメチルフェノキシヘキサン酸結合 BSA と、
ALP 標識抗 PCB#169 抗体を用いた PCB#169 の STD Assay

【図3】

PCB#169 STD Assay
3,4,5-トリメチルフェノキシ誘導体



3,4,5-トリメチルフェノキシヘキサン酸結合 BSA と、
ALP 標識抗 PCB#169 抗体を用いた PCB#169 の STD Assay

专利名称(译)	测量有机氯化合物的方法		
公开(公告)号	JP2002243738A	公开(公告)日	2002-08-28
申请号	JP2001073922	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 C07C59/68 G01N33/543 G01N33/547		
FI分类号	G01N33/53.S C07C59/68 G01N33/543.511.D G01N33/547		
F-TERM分类号	4H006/AA01 4H006/AA03 4H006/AB20 4H006/BJ50 4H006/BP30		
优先权	2000376083 2000-12-11 JP		
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合物（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，R1和R2为低级烷基，R3为氢原子或低级烷基，m为5~7的整数。）通过将有机氯化合物用作固相结合抗原或标记抗原的抗原，可以通过免疫测定法进行测量。

