

(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 - 38173

(P2003 - 38173A)

(43)公開日 平成15年2月12日(2003.2.12)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/02		C 0 7 K 16/44	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/44		C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10		G 0 1 N 33/531	A 4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/08			B 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/531		33/577	A

審査請求 未請求 請求項の数 17 O L (全 13数) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2002 - 141102(P2002 - 141102)	(71)出願人	000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(22)出願日	平成14年5月16日(2002.5.16)	(72)発明者	郷田 泰弘 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社生活環境カンパニ ー内
(31)優先権主張番号	特願2001 - 149832(P2001 - 149832)	(72)発明者	小林 綾子 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社生活環境カンパニ ー内
(32)優先日	平成13年5月18日(2001.5.18)	(74)代理人	100071973 弁理士 谷 良隆
(33)優先権主張国	日本(JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗体の選別方法、ハイブリドーマ、モノクローナル抗体及びその用途

(57)【要約】

【課題】 抗原の免疫測定法による分析、測定の際に、サンプル中に共存してくる可能性の高い抗原抗体反応妨害物質による影響を受けにくい抗体を選別し、それにより免疫測定法での異常値の発生を抑制する方法の提供。

【解決手段】 測定対象物の抗体を担体に固定化し、抗原酵素複合体 (標識抗原)、測定対象物質 (抗原) および反応妨害物質を固定化抗体に接触させ、酵素基質を添加して発色させ発色後、標準曲線から抗原量を算出し、その回収率から抗原抗体反応妨害物質耐性抗体を選別するという方法により上記課題を解決した。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】抗原抗体反応を用いて測定対象物質に対する抗体を選別するに際し、抗原抗体反応妨害物質の存在下に目的抗体を選別する抗体の選別方法。

【請求項 2】測定対象物質が環境汚染物質である請求項 1 記載の抗体の選別方法。

【請求項 3】測定対象物質がホルモンである請求項 1 記載の抗体の選別方法。

【請求項 4】抗体がモノクローナル抗体である請求項 1 記載の抗体の選別方法。

【請求項 5】抗原抗体反応妨害物質が、環境汚染物質またはその分解物、殺菌消毒剤、または溶媒である請求項 1 記載の抗体の選別方法。

【請求項 6】環境汚染物質が界面活性剤、環境水またはその濃縮物、またはフミン物質である請求項 5 記載の抗体の選別方法。

【請求項 7】界面活性剤が陰イオン界面活性剤、陽イオン界面活性剤または非イオン界面活性剤である請求項 6 記載の抗体の選別方法。

【請求項 8】環境水が河川水、湖沼水、海水、上水処理工程水または下水処理工程水である請求項 6 記載の抗体の選別方法。

【請求項 9】殺菌消毒剤が塩素剤である請求項 5 記載の抗体の選別方法。

【請求項 10】溶媒が、アルコール類、ニトリル類、ケトン類またはエステル類である請求項 5 記載の抗体の選別方法。

【請求項 11】測定対象物質又は測定対象物質のハプテンと蛋白質との複合体を抗原として免疫した動物から得られたポリクローナル抗体、または測定対象物質又は測定対象物質のハプテンと蛋白質との複合体を抗原として免疫した動物の脾臓細胞またはリンパ節細胞と骨髄腫細胞とを融合して得られる測定対象物質又は測定対象物質のハプテンとその蛋白質との複合体に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを培養して得られたモノクローナル抗体を、抗原抗体反応妨害物質の共存下に抗原酵素複合体（標識抗原）、測定対象物質又は測定対象物質のハプテンとその蛋白質との複合体（抗原）を反応させ、その反応率から抗原抗体反応妨害物質耐性抗体を選別する請求項 1 記載の抗体の選別方法。

【請求項 12】請求項 11 記載の抗体の選別方法により選別された抗原抗体反応妨害物質耐性モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 13】ハイブリドーマが、マウスハイブリドーマ E2-227 (FERM BP-7567)、マウスハイブリドーマ E1-420 (FERM BP-7568) 又はマウスハイブリドーマ E2-73 (FERM BP-7569) である請求項 12 記載のハイブリドーマ。

【請求項 14】請求項 11 記載の抗体の選別方法で選別

された抗原抗体反応妨害物質耐性抗体。

【請求項 15】請求項 12 記載のハイブリドーマによって産生された抗原抗体反応妨害物質耐性モノクローナル抗体。

【請求項 16】請求項 14 又は 15 記載の抗原抗体反応妨害物質耐性抗体を必須の構成成分として含んでなる測定対象物質の免疫学的分析用キット。

【請求項 17】請求項 14 又は 15 記載の抗原抗体反応妨害物質耐性抗体を必須の構成成分として含んでなる測定対象物質の免疫学的濃縮用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は抗原抗体反応妨害物質（以下、妨害物質を称することがある。）の存在下においてもその影響をなるべく受けずに抗原と反応する性質を有する抗体、すなわち妨害物質耐性抗体、その抗体の選別方法、その抗体を産生するハイブリドーマおよびその抗体の利用に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、環境測定分野などで、高価な機器が不要であり、また、操作に習熟が不要であることから、免疫測定法（イムノアッセイ、以下、IA と略記することがある。）が繁用されている。しかしながら、IA で使用される測定対象物質に特異的に作用する抗体は高分子量の蛋白質であるため、目的とする蛋白質に影響を及ぼす種々の物質によりその抗体の活性が影響を受け、その結果、測定対象物質の測定値が不正確となる場合が生じてくることがある。一方、ppb（パートパーピリオン、10億分の1）やppt（パートパートリオン、1兆分の1）のオーダーなど、ごく微量の測定対象物質を測定するためには、高倍率の濃縮操作が必要となる場合があり、そのような場合は固相抽出法を利用した濃縮（以下固相濃縮と略記することがある）や溶媒抽出による濃縮（以下、溶媒濃縮と略記することがある）などの操作により濃縮したサンプルを使用して測定対象物質が測定されている。しかし、検体サンプル中には測定対象物質以外にも種々雑多な化合物が混在しているため、固相濃縮や溶媒濃縮による濃縮操作を行うと、抗体に影響を及ぼす化合物、すなわち抗原抗体反応妨害物質も濃縮される結果、抗体の活性が影響を受け、測定対象物質の測定値に異常を来すケースも発生する。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題の1つは、抗原のIAによる測定の際に、サンプル中に混在する可能性が高い抗原抗体反応妨害物質による影響を受けにくい抗体を選別することにより、IAでの異常値の発生を抑制する方法を提供することにある。本発明の他の課題は、本発明で選別された抗体の利用により、異常値の発生が少ないIAキットを提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、夾雑する反応妨害物質の影響をなるべく受けずに I A により種々の物質を検出、測定する方法を確立すべく鋭意研究を重ねた。その結果、I A で使用する抗体を選別するに際し、反応妨害物質、例えば環境汚染物質またはその分解物、殺菌消毒剤、または溶媒等の存在下に抗原および標識抗原を抗体と反応させ、その反応率から反応妨害物質に対する耐性の高い目的抗体を選別することにより、測定対象物質の存在量が少ないために高倍率に濃縮したサンプルでも対象物質の測定が可能となることを見出した。かかる知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成させるに至った。

【0005】すなわち、本発明は、(1) 抗原抗体反応を用いて測定対象物質に対する抗体を選別するに際し、抗原抗体反応妨害物質の存在下に目的抗体を選別する抗体の選別方法、(2) 測定対象物質が環境汚染物質である(1)記載の抗体の選別方法、(3) 測定対象物質がホルモンである(1)記載の抗体の選別方法、(4) 抗体がモノクローナル抗体である(1)記載の抗体の選別方法、(5) 抗原抗体反応妨害物質が、環境汚染物質またはその分解物、殺菌消毒剤または溶媒である(1)記載の抗体の選別方法、(6) 環境汚染物質が界面活性剤、環境水またはその濃縮物、またはフミン物質である(5)記載の抗体の選別方法、(7) 界面活性剤が陰イオン界面活性剤、陽イオン界面活性剤または非イオン界面活性剤である(6)記載の抗体の選別方法、(8) 環境水が、河川水、湖沼水、海水、上水処理工程水または下水処理工程水である(6)記載の抗体の選別方法、(9) 殺菌消毒剤が塩素剤である(5)記載の抗体の選別方法、(10) 溶媒が、アルコール類、ニトリル類、ケトン類またはエステル類である(5)記載の抗体の選別方法、(11) 測定対象物質又は測定対象物質のハプテンと蛋白質との複合体を抗原として免疫した動物から得られるポリクローナル抗体、または測定対象物質又は測定対象物質のハプテンと蛋白質との複合体を抗原として免疫した動物の脾臓細胞またはリンパ節細胞と骨髄腫細胞とを融合して得られる測定対象物質又は測定対象物質のハプテンとその蛋白質との複合体に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを培養して得られたモノクローナル抗体を、抗原抗体反応妨害物質の共存下に抗原酵素複合体(標識抗原)、測定対象物又は測定対象物質のハプテンとその蛋白質との複合体(抗原)を反応させ、その反応率から抗原抗体反応妨害物質耐性抗体を選別する(1)記載の抗体の選別方法、(12) (11)記載の抗体の選別方法により選別された妨害物質耐性モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、(13) ハイブリドーマが、マウスハイブリドーマ E E 2 - 2 2 7 (FERMBP - 7 5 6 7)、マウスハイブリドーマ E 1 - 4 2 0 (FERMBP - 7 5 6 8) 又はマウスハイブリドーマ E 2 - 7 3 (FERMBP -

7 5 6 9) である(12)記載のハイブリドーマ、(14) (11)記載の抗体の選別方法で選別された抗原抗体反応妨害物質耐性抗体、(15) (12)記載のハイブリドーマによって産生された抗原抗体反応妨害物質耐性モノクローナル抗体、(16) (14)又は(15)記載の抗原抗体反応妨害物質耐性抗体を必須の構成成分として含んでなる測定対象物質の免疫学的分析用キット、および(17) (14)又は(15)記載の抗原抗体反応妨害物質耐性抗体を必須の構成成分として含んでなる測定対象物質の免疫学的濃縮用キット、を提供する。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明は、水性媒体中に、抗原抗体反応における妨害物質と測定対象物質に対する抗体とを共存させ I A により反応妨害物質耐性抗体を選別する抗体の選別方法に関する。

【0007】本発明に属するより具体的な抗体の選別方法の例は次のとおりである。すなわち、測定対象物質に対する抗体を含有する液を、そのまま、または予め担体に固定化した種特異的抗体と接触させ、しかるべき時間と温度で反応させることにより抗体含有液中の抗体を担体に固定化する。固定化されなかった抗体含有液中の抗体を洗浄液で洗浄除去後、抗原酵素複合体(標識抗原)、測定対象物質(抗原)および反応妨害物質を固定化抗体と接触させ反応させる。未反応の物質を洗浄除去したのち、酵素基質を添加し発色させる。発色後または発色停止後、吸光度や蛍光度を測定し、標準曲線から妨害物質共存時と非共存時の測定濃度を比較し、妨害物質耐性の度合いを計算する。計算の結果、反応妨害物質耐性の高い抗体を選別する。その抗体がモノクローナル抗体である場合は、その抗体を産生するハイブリドーマを特定する。そのハイブリドーマを培養し、培養上清から反応妨害物質耐性の高い抗体を得る。これらの抗体を利用して元の測定対象物質を I A により分析する。

【0008】本発明の選別対象とする抗体には、検出、測定に使用されるいかなる抗体も含まれる。抗体としては、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が挙げられる。

【0009】本発明の I A における測定対象物質としては、その抗体を使用して検出、測定される全ての物質が含まれ、例えば、環境汚染物質の測定などにおける全ての測定対象物質が挙げられる。測定対象物質の具体例としては、各種ホルモン類、植物ホルモン類、環境汚染物質類、合成界面活性剤類、農薬類、カビ毒類、トキシン類、薬剤類、アレルギー類、微生物類などが挙げられる。

【0010】各種ホルモン類の中で動物ホルモンとしては、エストロゲン、エストラジオール(E2)、エストロン(E1)、エストリオール(E3)などの女性ホルモン類、アンドロゲン、テストステロン、デヒドロアン

ドロステロン、アンドロステンジオンなどの男性ホルモン類、チロキシン(T3)、トリヨードチロニン(T4)などの甲状腺ホルモン類、エチニルエストラジオール、ジエチルスチルベストロール、ラロキシフェン、タモキシフェン、モキセストロール、アリルエストレノール、メストラノール、リネストレノール、酢酸クロルマジノン、ジドロゲステロン、メドロキシプロゲステロン、ノルエチステロン、ノルゲストレル、レボノルゲストレル、プレグナンジオール、クロミフェンなどの合成ホルモン類、プロゲステロン、ゼラノール、トレンボロン、クレンブテロール(アゴニスト)などのホルモン類が挙げられ、また、これらの代謝物である抱合体(例えば、グルクロン酸抱合体、硫酸抱合体など)およびこれらの分解物もこれらに包含される。

【0011】植物ホルモン類としては、イソリクイリチゲニン、フロレチン、クメストロール、ヘスペレチン、ナリンゲニン、アピゲニン、パイクレイン、クリシン、ルテオリン、ガラングイン、ケンフェロール、ケルセチン、エクオール、ピオカニンA、ダイゼイン、ホルムオノネチン、ゲニステイン、ベツリンなどが挙げられ、また、これらの代謝物、分解物もこれに包含される。

【0012】測定対象物質としての環境汚染物質類としては、フタル酸ベンジルブチル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジイソブチル、フタル酸ジ-n-プロピル、フタル酸ジ-n-ペンチル、フタル酸ジ-n-ヘキシル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)、フタル酸ジオクチル、フタル酸モノ(2-エチルヘキシル)、フタル酸ジイソノニル、フタル酸ジイソデシル、フタル酸ジ-*n*-オクチル、フタル酸ジトリデシルなどのフタル酸エステル類、アジピン酸ジ(2-エチルヘキシル)などのアジピン酸エステル類、4-エチルフェノール、3-*t*-ブチルフェノール、4-*s*-ブチルフェノール、4-*t*-ブチルフェノール、4-プロピルフェノール、4-イソペンチルフェノール、4-*t*-ペンチルフェノール、オクチルフェノール、4-オクチルフェノール、4-*t*-オクチルフェノール、4-(1,1,3,3,-テトラメチルブチルフェノール)、4-ノニルフェノール(直鎖)、4-ノニルフェノール(枝分かれ)、ノニルフェノール(混合異性体)などのアルキルフェノール類、ビスフェノールA、テトラプロモビスフェノールAなどのジフェニルアルカン類、ポリ臭素化ビフェニルなどのPBB類、ポリ臭素化ビフェニルエーテル類、スチレン、スチレン2量体、スチレン3量体、2-クロロフェノール、2,4-ジクロロフェノール、2,4,6-トリクロロフェノール、ペンタクロロフェノールなどのクロロフェノール類、*t*-ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、*n*-ブチルベンゼン、ベンゾフェノン、6-プロモ-2-ナフトール、ジプロモ酢酸、2-プロモプロパン、4-ニトロトルエン、オクタクロロスチレ

ンなどの内分泌攪乱化学物質などが挙げられ、また、これらの代謝物、分解物もこれに包含される。

【0013】さらに、2,3,7,8-テトラクロロダイオキシン(2,3,7,8-TCDD)などのダイオキシン類(Polychlorinated dibenzodioxins(PCDDs))、2,3,7,8-テトラクロロジベンゾフラン(2,3,7,8-TCDF)などのジベンゾフラン類(Polychlorinated dibenzofurans(PCDFs))、アロクロール1016、アロクロール1221、アロクロール1232、アロクロール1242、アロクロール1248、アロクロール1254、アロクロール1260、アロクロール1262、アロクロール1268、ピフェノクス、ハロワックス1000、ハロワックス1051、ハロワックス1099などのPCB類(Polychlorinated Biphenyls(PCBs))、アセナフテン、アセナフチレン、アンスラセン、ベンゾ[a]アンスラセン、ベンゾ[a]ピレン、ベンゾ[b]フルオランセン、ベンゾ[g,h,i]ペリレン、ベンゾ[k]フルオランセン、ピフェニル、クリセン、クレオソート、1,2-ジクロロベンゼン、2-エチルトルエン、4-エチルトルエン、ヘキサクロロベンゼン、ジベンゾ[a,h]アンスラセン、フルオランセン、フルオレン、ナフタレン、1-メチルナフタレン、2-メチルナフタレン、1-クロロナフタレン、*o*-クレゾール、フェナンスレン、*n*-プロピルベンゼン、ピレン、1,2,4-トリメチルベンゼン、1,3,5-トリメチルベンゼン、ガソリン、ケロセン、ジェットA燃料(Jet A fuel)、JP-4、JP-5、Fuel oil #1、Fuel oil #2、Fuel oil #4、Fuel oil #6、Heating fuel、ジーゼル油、タービン油、などの多環芳香族炭化水素類(Polynuclear Aromatic Hydrocarbons(PAHs))、環状多環芳香族炭化水素類(C-PAH)、全石油炭化水素類(Total Petroleum Hydrocarbons(TPHs))、BTEX(benzene, toluene, ethyl benzene, and xylene)、ベンゼン、2-アミノ-4,6-ジニトロトルエン、4-アミノ-2,6-ジニトロトルエン、2,4-ジニトロアニリン、1,3-ジニトロベンゼン、2,4-ジニトロフェノール、2-ニトロトルエン、3-ニトロトルエン、2,4-ジニトロトルエン、2,6-ジニトロトルエン、ピクリン酸、メチル-2,4,6-トリニトロフェニルニトラミン、1,3,5-トリニトロベンゼン、トリニトロトルエン(TNT)、オクタヒドロ-1,3,5,7-テトラニトロ-1,3,5,7-テトラゾシン、ニトログリセリン、ニトログアニジン、ペンタエリスリトール4硝酸、RDX爆薬(RDX Explosive)、3塩化金、硝酸銀、水銀、トリハロメタン、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレンなども含まれる。

【0014】合成界面活性剤類としては、例えば直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩などの陰イオン界面活性剤、ノニルフェノールエトキシレート、オクチルフェノールエトキシレートなどの非イオン界面活性剤などが挙げられ、又、これらの代謝物、分解物もこれに包含

される。

【0015】農薬類としては、カルプロパミド、チオカルバマート系化合物、クロルフェナピル、プレチラクロール、プロピザミド、クロルメコート、マラチオン、フェニトロチオン、イミダクロプリド、カルバリル、イナベンフィド、ブタミホス、プロベナゾール、イソプロチオラン、ベンタゾン、トルクロホスメチル、フェンスルホチオン、ベンダイオカルブ、イプロジオン、イソキサチオン、ピリミカーブ、オキサミル、ダミノジッド、ホキシム、イマザリル、マイクロブタニル、トリフルミゾール、ダイアジノン、プロピコナゾール、ピテルタノール、フェノキシ酢酸類、酸アミド系化合物の他、2,4-D、2,4-DNT、2,4-D酪酸ブチル、アセトアニリド、アセトクロール、アラクロール、スルホン酸アラクロール、アルディカルブ、アルディカルブスルホン、アルディカルブスルフォキサイド、アルドリン、アメトリン、アトラジン、アジンフォス、ベノミール、-BHC、-BHC、-BHC(リンデン)、ピオレスメトリン、キャプタン、カルバリル、カルベンダジム、カルボフラン、クロルダン、クロロタロニル、クロルピリホス、クロルピリホス-メチル、クロルスルフロニ、シアナジン、シクロジエン、DDD、DDE、DDT、ディカンバ、ジクロルプロブ、ディルドリン、ディクアット、ドルスパン、エンドスルファン、エンドリン、エチル化アトラジン、フェニトロチオン、ヘプタクロール、ヘキサジノン、ヒドロキシアトラジン、イマザキン、イマザピル、イソプロツロン、メツルフロニ、メタラキシル、メソミル、メソプレニ、メトラクロル、メトリブジン、モリネート、パラコート、パラチオン、ピクロラム、ピリミホスメチル、プロシミドン、プロメトン、プロメトリン、レルダン、シルベックス、シルベックス2,4,5-TP、シマジン、チアベンダゾール、トキサフェン、トリアスルフロニ、トリアジン、トリクロロピリヂノール、トリクロピル、トリフルラリン、尿素系除草剤などがも挙げられ、これらの代謝物、分解物もこれに含まれる。

【0016】カビ毒類としては、アフラトキシン、T2トキシン、オクラトキシン、ゼアラレノン、DON(デオキシニバレノール、ボミトキシン)、フモニシンなどが挙げられ、また、これらの代謝物、分解物もこれに含まれる。トキシン類としては、麻痺性貝毒、黄色ブドウ球菌エンテロトキシン(A, B, C, D, E)などが挙げられ、また、これらの代謝物、分解物もこれに含まれる。

【0017】薬剤類としては、ペニシリン、セファロスポリン、ペネム、モノバクタム、クラブラン酸などの骨格を含有するβ-ラクタム系抗生物質、モネンシン、サリノマイシン、エンジュラサイジンなどのポリエーテル系抗生物質、カナマイシンなどのアミノグリコシド系抗生物質、エンロフロキササンなどのニューキノロン系合成抗菌剤、サルファメタジン、サルファジメトキシンなど

のサルファ剤、クロラムフェニコール、ゲンタマイシンなどの抗生物質、ジゴキシン、テオフィリン、フェノバルピタール、トレンボロンなどの薬剤が挙げられ、またこれらの代謝物、分解物もこれに含まれる。

【0018】アレルゲン類としては、ハウスダスト、ダニ、ネコ上皮、イヌ上皮、スギ、ヒノキ、ハンノキ、ハルガヤ、カモガヤ、オオアワガエリ、ブタクサ、ヨモギ、アスペルギルス、カンジダ、アルテルナリア、卵白、牛乳、小麦、米、大豆、タラ、マグロ、カニ、エビ、ペニシリウム、クラドスポリウム、チェダーチーズ、牛肉、鶏肉、サケなどのアレルゲンが挙げられ、また、これらの代謝物、分解物もこれに含まれる。

【0019】微生物類としては、サルモネラ、リステリア、大腸菌、クリプトスポリジウム、ジアルジア、カンピロバクター、黄色ブドウ球菌、エルシニア、腸炎ピブリオ、真菌などの病原菌が挙げられ、その構成成分もこれに含まれる。

【0020】一方、抗原抗体反応妨害物質としては抗体や酵素などのたんぱく質に影響を与える物質、例えば環境汚染物質類、その分解物、殺菌消毒剤類、溶媒類などが挙げられる。環境汚染物質類やその分解物としては、界面活性剤類、環境水およびその濃縮物、フミン物質類等が挙げられる。

【0021】界面活性剤類としては、油脂、脂肪酸などのカルボン酸型、アルキルサルフェート、アルキルエーテルサルフェートなどの硫酸エステル型および/またはアルキル(アリル)スルホネート、(アルキル)ナフタリン酸などのスルホン酸型やアルキルリン酸エステルなどのリン酸エステル型などの陰イオン界面活性剤類、4級アンモニウム型などの陽イオン界面活性剤類、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルアリルエーテル、その他のエーテルなどのエーテル型、多価アルコール系エステル・エーテルやその他のエステルエーテルなどのエステルエーテル型、多価アルコール・エステルなどの非イオン界面活性剤類が挙げられる。フミン物質としては、フルボ酸、フミン酸、フミンおよびまたはその塩などが挙げられる。

【0022】環境水およびその濃縮物としては、河川水、湖沼水、海水、上水処理工程水、下水処理工程水およびそれらの濃縮物が挙げられる。殺菌消毒剤類としては塩素剤類である塩素ガスや次亜塩素酸とその塩が挙げられる。

【0023】溶媒としては、アルコール類、ニトリル類、ケトン類、エステル類などが挙げられ、アルコール類としては、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ニトリル類としては、アセトニトリル、ケトン類としては、アセトン、メチルイソブチルケトン(MIBK)、エステル類としては、酢酸エチル、などが挙げられる。

【0024】測定対象物質に対する抗体であるイムノグ

ロブリン (I g) の製造や、該 I g に対する抗体 (即ち抗 I g 抗体) の製造は、自体公知の方法、例えば、エンザイムイムノアッセイ、第 4 6 頁 ~ 7 1 頁及び第 8 5 頁 ~ 1 1 0 頁 (P. TIJSSSEN 著、石川栄治監訳、東京化学同人 (1989)) に記載された方法あるいはこれに準じる方法により行うことができる。

【0025】これらの方法において、自体免疫原と成りうる測定対象物質はそのまま、自体免疫原性を持たない測定対象物質はそのハプテンを作製した後キャリアー蛋白質との複合体 (免疫原) を形成させて動物に接種する。複合体を形成させて免疫する際のキャリアー蛋白質としては、例えば、牛血清アルブミン (以下、BSA と略す)、卵白アルブミン (以下、OVA と略す)、スカシ貝ヘモシアニン (以下、KLH と略す)、牛チログロブリン (以下、BTG と略す) などが挙げられる。

【0026】測定対象物質とキャリアー蛋白質との複合体の形成は、例えば、式 (1)



(式中、R は、COOH、NH₂ 又は SH を、A は、R 基の離脱により、測定対象物質となる基を示す。) で表される化合物 (ハプテン) を、自体公知の方法によりキャリアー蛋白質に融合させることにより行うことができる。例えば、R が COOH で、A がポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルとなる式 (1) で表される化合物は、ポリオキシアルキルフェニルエーテルと無水コハク酸を脱水縮合 (ハーフエステル) することにより製造できる [キャンサー・バイオケミストリー・バイオフィジックス (Cancer Biochem. Biophys.), 7, 175 (1984)]。R が NH₂ で、A がポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルとなる式 (1) で表される化合物は、ポリオキシアルキルフェニルエーテルの水酸基を塩化チオニルにより塩酸化した後 [ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティー (J. Am. Chem. Soc.), 60, 2540 (1938)]、アンモニアで処理することにより製造できる [オーガニック・ファンクショナル・グループ・プレパレーションズ (Organic Functional Group Preparations)、第 1 巻、382 頁]。

【0027】R が SH で、A がポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルとなる式 (1) で表される化合物は、ポリオキシアルキルフェニルエーテルの水酸基を塩化チオニルにより塩酸化した後 [ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティー (J. Am. Chem. Soc.), 60, 2540 (1938)]、水酸化ナトリウムと反応させることにより製造できる [ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティー (J. Am. Chem. Soc.), 72, 1843, (1950)]。

【0028】本発明における測定対象物質に対する抗体は、自体公知の方法、すなわち測定対象物質または、上記のような測定対象物質のハプテンとキャリアー蛋白質

との複合体 (免疫原) で免疫した動物から得られるポリクローナル抗体又は該免疫した動物の脾細胞又はリンパ節細胞と、骨髄腫細胞とを融合させて得られるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマに産生させることにより製造することができる。動物を免疫するには、測定対象物質又は上記で得られたハプテンとキャリアー蛋白質との複合体を動物に接種する。接種する動物としては、例えば、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、ラット、マウス、モルモット、ニワトリなどが用いられるが、測定対象物質に対するモノクローナル抗体が所望の場合には、マウスが特に好ましく用いられる。接種方法としては、通常実施される方法でよく、例えば、マウスに対し 1 回に約 1 ~ 100 μg、好ましくは 50 ~ 100 μg を等容量 (0.1 ml) の生理食塩水及びフロイントの完全アジュバンド又は RIBI アジュバンドシステム™ で乳化して、背部、腹部の皮下あるいは腹腔内に 2 ~ 3 週毎に 2 ~ 6 回接種する方法がとられる。ポリクローナル抗体を得る場合には接種された動物の血清から、採取することにより行われる。モノクローナル抗体を得るには、さらに次の操作が行われる。これらの免疫動物、例えば、マウスから抗体価の高い個体を選び、最終免疫 3 ~ 5 日後に脾臓あるいはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させる。免疫する方法としては、既知のインビトロ免疫法 (in vitro immunization) やマウスフットパッド法 (Mouse Foot Pad) などを使用すれば、より短期間で抗体価が上昇する。

【0029】融合操作は既知の方法に従って実施でき、融合促進剤としては、ポリエチレングリコール (以下、PEG と略す) や、センダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくは、PEG が用いられる。既知の電気パルスを用いた方法 (Pulse Electric Fusion) によっても実施できる。骨髄腫細胞としては NS - 1、P3U1、Sp2/O などが用いられ、特に P3U1 が好ましい。例えば、脾細胞と骨髄腫細胞との好ましい比率は約 1 : 1 ~ 10 : 1 で、これに分子量約 1,000 ~ 6,000 の PEG が約 10 ~ 80% の濃度で添加され、約 20 ~ 37、好ましくは 30 ~ 37 で約 3 ~ 10 分インキュベートするのがよい。ハイブリドーマによるモノクローナル抗体の産生、精製も自体公知の方法で行うことができる。得られたモノクローナル抗体は、測定対象物質や、式 (1) で表される化合物に対する抗体となる。

【0030】抗体の産生、精製方法の具体例としては、例えば、前記「エンザイム・イムノアッセイ」第 4 6 ~ 7 1 頁、第 8 5 ~ 1 1 0 頁に記載され、塩析 (Na₂SO₄、(NH₄)₂SO₄)、イオン交換体 (DEAE、QAE、CM / セルロース、セファデックス、セファロースなど)、ゲル濾過 (セファデックス G-200、Bio-gel P-300 など)、電気泳動 (アガロースゲルによるゾーン電気泳動、等電点電気泳動、等速電気泳動など)、

超遠心（シヨ糖密度勾配遠心法）、アフィニティークロマトグラフィー（固定化プロテインA（Protein A Sepharose、Protein A Superose など）固定化プロテインG（Protein-G Sepharoseなど））などの方法が挙げられる。

【0031】本発明で用いる抗体固定化用担体（以下、担体と称することもある。）としては、免疫測定法において通常用いられるものを用いることができる。その例としては、例えば、マイクロプレート（例、96ウェルマイクロプレート、24ウェルマイクロプレート、192ウェルマイクロプレート、384ウェルマイクロプレートなど）、試験管（例、ガラス試験管、プラスチック試験管）、ガラス粒子、ポリスチレン粒子、修飾ポリスチレン粒子、ポリビニル粒子、ラテックス（例、ポリスチレン・ラテックス）、ニトロセルロース膜、臭化シアン活性化濾紙、DBM活性化濾紙、粒状固相（例、セファロース、セファデックス、アガロース、セルロース、セファクリルなど）、鉄含有ポリカーボネート膜、マグネット含有ビーズなどが挙げられる。担体に抗体を担持させるには、自体公知の方法〔例、上記「エンザイムイムノアッセイ」第268～296頁、「アフィニティークロマトグラフィーハンドブック」（アマシャムファルマシアバイオテック株式会社（1998年12月20日発行））などで担持できる。

【0032】抗原抗体反応妨害物質耐性抗体を取得するときの抗体含有液としては、免疫中の動物の血清、HATスクリーニングにより融合細胞（ハイブリドーマ）のコロニーが確認されたwellの培養上清、クローニング途中のハイブリドーマの培養上清、クローニングにより純化されたハイブリドーマの培養上清、マウス腹水で増殖した純化ハイブリドーマの腹水液、またはマウス腹水液から精製された抗体液など、抗体取得行程のどの段階の抗体含有液を使用しても良い。なお、抗体含有液の抗体濃度により、抗体含有液を希釈して添加する場合もある。この希釈倍数は、抗体濃度とアッセイ条件により異なるが、通常数倍から数十万倍迄希釈して測定する必要がある場合もある。抗原酵素複合体（標識抗原）としては、取得中の抗体と反応するものであれば、どのような構造のものでも良い。また、酵素およびその基質としては、通常の酵素免疫測定法で使用される酵素およびその基質であればどのようなものでも良く、アルカリホスファターゼ、アルコール脱水素酵素、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、西洋わさびペルオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、インペルターゼ、アセテートキナーゼやその基質などが好ましいが、測定感度の点から西洋わさびペルオキシダーゼとその基質が好ましい。

【0033】抗原酵素複合体（標識抗原）の添加濃度は、測定対象物質（抗原）および妨害物質を添加しないブランク時に吸光度が1～2となるようにリン酸緩衝

液、生理的食塩水等で希釈しておくのがよい。添加する測定対象物質は、妨害物質無添加時の阻害率が約50%となるよう緩衝液や10%メタノール等で希釈し、妨害物質の添加濃度は、最終濃度で1～1000 mg/Lとなるよう緩衝液や10%メタノール等で段階希釈する。環境水およびその濃縮物などの妨害物質は、原液またはその濃縮液を使用する。環境水の濃縮液の作製は、溶媒濃縮、固相濃縮や蒸発乾燥による濃縮など、既知のどのような方法でも良く、その濃縮倍率は、用いる環境水の種類により異なってくるが、固化してしまい、緩衝液や溶媒等で溶解液を作製することができなくなるような状態にならなければ、どのような濃縮倍率でも良い。なお、妨害物質として溶媒を使用するときは100%未満の範囲で添加する。抗原酵素複合体（標識抗原）、測定対象物質（抗原）、妨害物質は混合後、固定化測定対象物質抗体または固定化種特異的抗体と結合した測定対象物質抗体と反応させるが、反応温度および反応時間は、測定対象物質抗体や種特異的抗体が変性しない温度および時間であればどのような条件でも良いが、4℃では一晩（16～24時間）、室温では0.1～4時間が好ましい。未反応物質の洗浄液は、上記抗体が変性しない洗浄液であればどのような液でも良いが、pHの変動を押さえるために、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）や、ツイーン-20を含むT-PBS等が好ましい。

【0034】発色用の酵素基質は、使用した酵素の基質であればどのようなものでも良い。例えば、アルカリホスファターゼの場合は、比色法では、*p*-ニトロフェニルリン酸、フェニルリン酸 / 4-アミノアンチピリン、蛍光法では、4-メチルウンベリフェリルリン酸、*o*-メチルフルオレッセイン酸、フラボン-3-ジリン酸、化学発光法では、オキシデレクターゼ / エタノール / ADH / NADH、イソルミノール / マイクロペルオキシダーゼ、アスコルビン酸-2-リン酸 / ルシゲニン / OH⁻、BCIP（5-ブロム-4-クロロ-3-インドキシリル）リン酸 / イソルミノール / マイクロペルオキシダーゼ、AMPPD（3-（2-スピロアダマンタン）-4-メトキシ-（3-ホスホリルオキシ）フェニル1,2-ジオキセタン）、CSPD（3-（2-クロリナルドアダマンタン）-4-メトキシ-（3-ホスホリルオキシ）フェニル1,2-ジオキセタン）、生物発光法では、D-ルシフェリンリン酸 / ルシフェラーゼなどが、ペルオキシダーゼの場合は、比色法では、5-アミノサリチル酸 / 過酸化水素、ABTS（2,2'-アジノジ（3-エチルベンズチアゾリン）-6-スルホン酸） / 過酸化水素、テトラメチルベンチジン / 過酸化水素、*o*-フェニレンジアミン / 過酸化水素、蛍光法では、ホモバニリン酸 / 過酸化水素、チラミン / 過酸化水素、*p*-ヒドロキシフェニルプロピオン酸 / 過酸化水素、化学発光法では、ルミノール / 過酸化水素、ルミノール / 過酸化水素 / *p*-ヨードフェノールなどが、グルコースオキシダ

ーゼの場合は、比色法では、グルコース/西洋わさびペルオキシダーゼ/ABTS(2,2'-アジノジ(3-エチルベンズチアゾリン)-6-スルホン酸)、蛍光法では、グルコース/西洋わさびペルオキシダーゼ/p-ヒドロキシフェニルプロピオン酸、化学発光法では、グルコース/ルミノール/Fe(CN)₆³⁺、グルコース/TCPO(ビス(2,4,6-トリクロロフェニル)オキサレート)/ANS(8-アニリノナフタレンスルホン酸、グルコース/イソルミノール/マイクロペルオキシダーゼ、グルコース/ルシゲニン/OH⁻/塩化銅などが、
 10 -D-ガラクトシダーゼの場合は、比色法では、o-ニトロフェニル-D-ガラクトピラノシド、蛍光法では、4-メチルウンベリフェリル-D-ガラクトシド、化学発光法では、ラクトース/グルコースオキシダーゼ/イソルミノール/マイクロペルオキシダーゼ、ラクトース/グルコースオキシダーゼ/TCPO(ビス(2,4,6-トリクロロフェニル)オキサレート)/ANS(8-アニリノナフタレンスルホン酸)、AMPGD(3-(4-メトキシスピロ(1,2-デオキシジオキシタン-3,2-トリデカン-4-フェニル)、o-NPGal(o-ニトロ-

-D-ガラクトシド)/GalDH(ガラクト-ステハイドロゲナーゼ)/NAD⁺/NADH、生物発光法では、o-NPGal(o-ニトロ-D-ガラクトシド)/GalDH(ガラクト-ステハイドロゲナーゼ)/NAD⁺/NADHなどが、グルコース-6-リン酸脱水素酵素の場合は、吸光度法では、グルコース-6-リン酸/NADP⁺、化学発光法では、グルコース-6-リン酸/NAD(P)⁺/NAD(P)Hなど、数多くの基質が知られており、使用する酵素の基質であればどのような基質でも使用可能である。
 【0035】発色後は、そのまま、または反応停止液を
 30 添加して、所定の波長で測定する。例えば、アルカリフォスファターゼの場合は、p-ニトロフェニルリン酸基質では比色法405nmで、4-メチルウンベリフェリルリン酸基質では蛍光法で、AMPPDやCSPDでは化学発光法で、ペルオキシダーゼの場合は、5-アミノサリチル酸基質では比色法492nmで、ABTS基質では比色法340nmまたは414nm(酸化物)で、o-フェニレンジアミン基質では比色法492nm(pH1.0)または445nm(pH5.0)で、テトラメチルベンチジン基質では比色法655nmまたは450nm(塩酸や硫酸で反応停止時)、p-ヒドロキシフェニルプロ

40 ピオン酸では蛍光法で、ルミノール/過酸化水素基質では、化学発光法で測定する。測定後は、市販のデータ処理ソフトウェア(例えばデルタソフト)などを使用し、妨害物質を添加したものと添加しないものについて濃度を算出する。得られた濃度を下記のとおり妨害物質の有無による回収率により比較し、より高濃度の妨害物質の添加時でも回収率が100%に近くなるもの(50~200%)を、妨害物質耐性の高い抗体として選択する。回収率は次の計算式により算出する。

回収率(%) = 測定対象物質算出濃度 / 添加した測定対

象物質濃度 × 100

所望の抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングは、種々の方法が使用できるが、例えば、測定対象物質のハプテンを結合させたOVAを吸着させたマイクロプレートにハイブリドーマ培養上清を添加し、ついで、西洋わさびペルオキシダーゼ(以下、HRPと略す)標識した抗マウス免疫グロブリン抗体を加え、プレート固相に結合した抗体を検出するELISA法などが挙げられる。抗体活性陽性のハイブリドーマを直ちにクローニングに供するが、通常これは即知の限界希釈法などで容易に実施される。

【0036】クローン化されたハイブリドーマ上清の抗体価を上記の方法で測定し、安定的に力価の高い抗体を産生するハイブリドーマを選別し、目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを取得することができる。このような方法により得られるハイブリドーマとしては、例えば、後述の実施例1において得られたマウス-ハイブリドーマEE2-227、E1-420及びE2-73が挙げられる。これらは独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに、2001年4月25日、それぞれ受託番号FERM-BP7567、FERM-BP7568およびFERM-BP7569として寄託されている。

【0037】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

実施例1

1.モノクローナル抗体の取得

1-1 ハプテンの作成

(1)エチニルエストラジオール抗体用ハプテンの作成
 エチニルエストラジオール(EE2)1.0gとナトリウムメチラート0.76gをエタノール35mlに溶解し、更にモノクロル酢酸0.41gを添加した後、22時間加熱還流した、減圧濃縮後、水、酢酸エチル各約100mlを加えて分液した。水層を酢酸エチル50mlで洗浄後、濃塩酸で水層を酸性化した(pH1-2)。酢酸エチル100mlおよび50mlで抽出後、有機層を飽和食塩水30mlで洗浄し、無水硫酸ナトリウムにて脱水した。減圧濃縮液を-20℃で2日間静置することにより一部が結晶化した。この一部を採取し、種
 40 結晶とした。濃縮液を少量のアセトンに溶解し、ヘキサンおよび種結晶を加え結晶を沈殿させた。濾取した結晶を減圧乾燥することにより目的物EE2-3-カルボキシメチルエーテル(EE2-3CME)を取得した。

【0038】(2)17-エストラジオール抗体用ハプテンの作成

17-エストラジオール(E2)1.0gとナトリウムメチラート0.82gをエタノール35mlに溶解し、更にモノクロル酢酸0.45gを添加した後、2日間加熱還流した、減圧濃縮後、水約300ml、酢酸エチル約200mlを加えて分液した。水層を酢酸エチル50mlで洗浄後、濃塩酸で水層を酸性化

した(pH1-2)。酢酸エチル100mlで2回抽出後、有機層を飽和食塩水30mlで洗浄し、無水硫酸ナトリウムにて脱水した。減圧濃縮液を少量のアセトンに溶解し、イソプロピルエーテル(IPE)を加え結晶を沈殿させた。濾取した結晶をIPEにて洗浄後、減圧乾燥することにより目的物E2-3-カルボキシメチルエーテル(E2-3CME)を取得した。

【0039】(3)エストロン抗体用ハプテンの作成
 エストラジオール-3,17-ジアセテート(E2-3,17-diAce)20gを酢酸25mlに溶解し、これを冷やしながらか無水クロム酸9g、酢酸27ml、水4mlの混液の4/5を徐々に加える。一夜攪拌後、水を加えてクロロホルムで抽出し、炭酸カリウム溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで脱水後、減圧濃縮した。濃縮液をベンゼンに溶解後、カラムクロマトグラフィー(Wako gel 2w)にかけ、熱ベンゼンで溶出し、粗6-オキソ-E2-3,17-diAceを分取した(TLCで確認しながら原料を除去)。本物質を2-メトキシ-エタノールに溶解し、20%NaOHを同量加え、100、1時間反応させた。希塩酸にて酸性化後、酢酸エチルで溶出し、硫酸ナトリウムで脱水後、減圧濃縮し、メタノールから再結晶させた(6オキソ-E2)。6オキソ-E2 300mgをエタノール2mlに溶解し、炭酸カリウム微細粉末を50mg添加し、ベンジルプロマイド50 μ lを添加し、攪拌(70、2時間)し、濃縮物をメタノールを用い、再結晶化した(6-オキソ-E2-3-ベンジルエーテル)。6-オキソ-E2-3-ベンジルエーテルをメタノールに溶解し、カルボキシメトキシルアミン \cdot 1/2HClとナトリウムメトキシド(1.2モル量)を少量の水で溶かし、メタノールで薄めて加えた。室温で1時間反応させ、2/3を蒸発させ、水とHClで酸性化後、酢酸エチル抽出、硫酸ナトリウムで脱水した。ヘキサンの溶解後、シリカゲルカラムに供与し、メタノールで溶出することにより、精製後、メタノールから再結晶させた。再結晶した物質0.6gをアセトン2mlに溶解し、無水クロム酸1g、酢酸5ml、水1mlの混液の半分を加え、発熱が終了後、酢酸エチルにより、抽出し、蒸発乾固した(6-オキソ-E1-3-ベンジルエーテル)。6-オキソ-E1-3-ベンジルエーテル 400mgをメタノール5mlに溶解し、5% Pd \cdot C 100mgを加え水素を通して攪拌した。1時間反応後蒸発乾固させ、メタノールから再結晶させることにより、目的物6-オキソ-E1-6カルボキシメチルオキシム(E1-6CMO)を取得した。

【0040】1-2 免疫原の調製

1-1で得られた3種のハプテンについてそれぞれ、ハプテン0.1モル、水溶性カルボジイミド0.14モル、N-ヒドロキシコハク酸イミド0.14モルをジメチルスルホキシド2ml中で一晩反応させて、活性化エステルを作成した。次にスカシガイヘモシアニン(KLH)10mgを0.13モル重炭酸ナトリウム(NaHCO₃)溶液に溶解し、本活性化エステル200 μ lを添加後、一晩4で反応させた。ダルベッコリン酸緩衝液(PBS)に対する透析により未反応の試薬

を除去し、免疫原として凍結保存した

【0041】1-3 免疫

1-2で得られた免疫原を500 μ g/mlとなるようにPBSに溶解し、等量のフロイントアジュバントまたはRIBIアジュバントシステムに添加した。充分乳濁後、BALB/Cマウス(メス)に100 μ g/マウスで皮下投与し、2週間(フロインド)もしくは3週間(RIBI)間隔で追加免疫を実施した。5~6回の追加免疫後、最大の血清抗体価を示した個体について、同免疫原を静脈投与し(50 μ g/0.1ml PBS/マウス)最終免疫とした。

【0042】1-4 細胞融合

1-3で最終免疫を実施したマウスから脾臓を摘出し(最終免疫から3日後)、脾臓細胞を調製した。別途培養したマウスミエローマ細胞と脾臓細胞を1:5の割合でポリエチレングリコール(平均分子量4000)存在下で接触させ、細胞融合を実施し、融合細胞(ハイブリドーマ)を得た。このハイブリドーマをHAT培地に懸濁後、96wellマイクロプレートに巻き込み、炭酸ガスインキュベーター(37、5%CO₂)中で培養した。

【0043】1-5 ハイブリドーマのスクリーニング(1)アッセイプレートの作成

ヤギ抗マウスIgAGM抗体(ICN/Cappel製、#55461)をPBSに50 μ g/mlで溶解し、マイクロプレートに100 μ l/wellで添加した。4で一晩反応させた後、0.05%Tween20を含むPBS(T-PBS)にて洗浄後(300 μ l/wellで2回)、PBSにて4倍希釈したブロックエース(雪印乳業(株)、東京)を200 μ l/well添加した。4で一晩以上反応させた後、使用時まで冷蔵で保存した。

【0044】(2)抗原酵素複合体(標識抗原)の作成

1-1で作成した3種のハプテンについてそれぞれ、ハプテン0.1モル、水溶性カルボジイミド0.14モル、N-ヒドロキシコハク酸イミド0.14モルをジメチルスルホキシド2ml中で一晩反応させて、活性化エステルを作成した。次に西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)10mgを0.13モル重炭酸ナトリウム(NaHCO₃)溶液10mlに溶解し、本活性化エステル15 μ lを添加後、一晩4で反応させた。限外ろ過により未反応の試薬を除去し、3mg/mlの濃度で冷蔵保存した。

【0045】(3)1次スクリーニング(抗原結合能試験)

1-4で細胞を巻き込んだマイクロプレートについて、細胞の増殖が確認されたwellの培養液100 μ lを(1)で作成したアッセイプレート(使用前にPBS(またはT-PBS)にて洗浄後(300 μ l/wellで2回))へ添加した。室温で1時間反応後、T-PBSにて洗浄し(300 μ l/wellで3回)、1-5(2)で作成した目的抗体の標識抗原をT-PBSに5000倍希釈して、マイクロプレートに添加した。室温で1時間反応後、T-PBSにて洗浄し(300 μ l/wellで3回)、TMB[®]-キタダ[®]基質キット(日本バイオ・ラッド、東京、#172-1066:以下発色基質)を100 μ l/wellで添加した。30

分室温で反応後、1 Nリン酸を100 μl/wellで添加し、発色反応を停止させた。450nmの波長で吸光度を読みとり、吸光度1を越える細胞については24wellマイクロプレートヘスケールアップした。

【0046】(4) 2次スクリーニング(女性ホルモン妨害試験)

1-5(3)で24wellマイクロプレートヘスケールアップした細胞について、充分な細胞増殖が確認されたwellの培養液を(1)で作成したアッセイプレート(使用前にPBS(またはT-PBS)にて洗浄後(300 μl/wellで2回))へ100 μlずつ複数のwellに添加した。室温で1時間反応後、T-PBSにて洗浄し(300 μl/wellで3回)、測定対象とする女性ホルモン(1ng/ml in 10%メタノール(以下MeOH))、もしくは10% MeOHのみ(対照)と目的抗体の標識抗原(T-PBSで5000倍希釈)を等量混合し、マイクロプレートに添加した。室温で1時間反応後、T-PBSにて洗浄し(300 μl/wellで3回)、発色基質を100 μl/wellで添加した。30分室温で反応後、1 Nリン酸を100 μl/well添加し、発色反応を停止させた。450nmの波長で吸光度を読みとり、対照と比較して、女性ホルモンの存在により吸光度の低下が20%以上確認された細胞について常法に従いクロニングを実施し、以下に示す目的抗体産生ハイブリドーマ候補株を取得した。

【0047】1-6 精製抗体の取得

細胞培養上清については45-50%飽和硫酸アンモニウムで分画後、マウス腹水はそのまま常法により、プロテインGアフィニティークロマトグラフィーにて抗体を*

妨害物質の影響濃度

測定対象	抗体	スクリーニング時 妨害物質有無	影響濃度 (ppm)			
			LAS	APE	AE	フミン酸ナトリウム
EE2	EE2-227	有り	1000	1000	1000	100
	EE2-8	無し	10	10	10	10
E2	E2-73	有り	1000	100	>1000	100
	E2-CC (市販キット)	無し	100	100	100	100
	E2-NG (市販キット)	無し	100	100	10	100
	E2-RB (市販キット)	無し	100	10	100	100
E1	E1-420	有り	1000	100	>1000	10

市販キット略号

E2-CC (Estradiol Enzyme Immunoassay Kit, Cat#582251, Cayman Chemical Company, USA)

E2-NG (Estradiol ELISA Kit, Product #402110, Neogen Corporation, USA)

E2-RB (RIDASCREEN Estradiol, Cat#04031, R-Biopharm GmbH, Germany)

【0051】抗EE2抗体では、本選択法で選出した抗EE2-227抗体が、本選択法によらずに取得した抗EE2-8抗体(対照)と比べて、約10~100倍高濃度の妨害物質を添加しても回収率が50~200%程度であったことから、その反応妨害物質に対する耐性度の高い抗体を産生するマウスハイブリドーマEE2-227株(FEEMBP-7567)を選別した。また、抗E2抗体では、本選択法で選出した抗E2-73抗体が、本選択法によらずに取得された3種(E2-CC, E2-NG, E2-RB)の市販ELISAキット使用抗体に比べて、約10~100倍高濃度の妨害物質(界面活性剤)を添加しても、回収率が50~200%であったことから、その反応妨害物質に対する高

*取得、精製した。

【0048】2. 妨害物質耐性抗体の選別

1-5(4)で取得した細胞の培養上清を用いて、各抗体の妨害物質耐性試験を実施した。なお、妨害物質としては環境中に高濃度で存在し、かつ測定試料前処理段階で測定物質と共に濃縮される可能性のある物質である、界面活性剤およびフミン物質を使用した。

【0049】実験方法

1-5(4)に準じて、女性ホルモン測定感度が最も高くなる培養上清の希釈倍率を求めた。次に、その濃度で培養上清中の抗体を抗マウスIgGプレートに結合させておいたプレートに対し、以下のサンプルと対象抗体の標識抗原(T-PBSで5000倍希釈)を等量混合後、100 μl添加した。サンプルとしては直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS)、アルキルフェノールエトキシレート(APE)、アルキルエトキシレート(AE)(各0, 1, 10, 100, 1000mg/L in 10%MeOH)、フミン酸ナトリウム(0, 1, 10, 100mg/L in 10%MeOH)溶液に測定対象の女性ホルモンを0.5 μg/Lとなるように添加したもの、および添加しないものを使用した。1-5(4)に準じてELISA測定を行い、既知濃度の標準液により作製した標準曲線と比較することによりサンプル中の女性ホルモン濃度を算出した。その算出値を添加した女性ホルモン濃度(0.5 μg/L)で割り100倍して回収率を算出した。

【0050】結果

【表1】

い耐性度を有する抗体を産生するマウスハイブリドーマとしてE2-73株(FEEMBP-7569)を選別した。また、本選択法で選出した抗E1-420抗体も抗E2-73抗体に匹敵する高い界面活性剤耐性を有することから、その抗E1-420抗体を産生するマウスハイブリドーマとしてE1-420株(FERM-BP-7568)を選別した。

【0052】実施例2 EE2-ELISAキットの作製

(1)「固相化プレート」の作製

Dulbecco'sPBS(-)(和光純薬 CodeNo.041-20211)に溶解したヤギ抗マウスIgG抗体(ICN/Cappel社 CodeNo.55479)を0.5 μg/wellになるよう固相化プレート(Costa

r, EIA/RIA plate strip8, #2592) に分注し、4 で一晚静置後、洗浄液 (T-PBS) 300 μ L で3回洗浄した。ブロッキング液 (1%BlockAce (雪印乳業) +0.05%スラオフ72N (武田薬品) in PBS) 200 μ L/well を添加し、4 で一晚静置後、洗浄液 (T-PBS) 300 μ L で3回洗浄した。ついで、PBS (含0.05%スラオフ72N+0.1%BSA) に溶解したエチニルエストラジオール抗体 (EE2-227) を0.002 μ g/well ずつ添加し、4 で一晚静置後、洗浄液 (T-PBS) 300 μ L で3回洗浄した。ブロッキング液 (1%BlockAce (雪印乳業) +0.05%スラオフ72N (武田薬品) in PBS) 200 μ L/well を添加し、4 で一晚静置後、アスピレーターで全量を吸引後、タッピングにより水分を除去した。脱水乾燥した固相化プレートをアルミ袋に封入し、真空乾燥機により脱気およびシールをして、2~8 の冷蔵庫に保存した。

【0053】(2) 「EE2標準原液」(0.1mgEE2/L 10%MeOH)の作製

原液1 (1000mgEE2/L) の調製: エチニルエストラジオール標準品 (和光純薬CodeNo.055-05011) を、その含量100%に対して100mgを正確に秤量し、100mlメスフラスコに入れ、メタノールでメスアップした。原液2 (10mgEE2/L) の調製: 原液1 1mlをホールピペットで正確に秤り取り、100mlメスフラスコに入れ、メタノールでメスアップする。標準原液 (0.1mgEE2/L) の調製: 原液2 1mlをホールピペットで正確に秤り取り、100mlメスフラスコに入れ、メタノール、蒸留水でメスアップし最終10%メタノール溶液となるよう調製した。適切な容器に4mlの標準原液を入れ、2~8 の冷蔵庫に保存した。

【0054】(3) 「抗原酵素複合体溶液」の作製

水溶性カルボジイミド (WSC 同仁化学 'ペプチド' 合成用 CodeNo.348-03631) 26mgとNヒドロキシサクシンイミド (NHSI 和光純薬 'ペプチド' 合成用 CodeNo.089-04032) 16mgをジメチルスルホキシド (DMSO和光純薬 特級) 2mlに溶解した。その内の0.5mlと実施例1で作成したハプテン (EE2-3CME) 10mgを1mlのDMSOに溶解し、室温で一晩反応させた。得られた反応液13 μ Lと10mlの1.1%NaHCO₃に溶解したペルオキシダーゼ (POD 'ペーリンガ-EIA用 CodeNo.814393) 10mgを4 で一晚攪拌しながら反応させ、得られた反応液を分画分子量 30,000の限外濾過膜で濾過し、0.05%スラオフ72N含有PBSで最終30mlとすることにより、抗原酵素複合体溶液を得た。この溶液200 μ Lを適切な容器に分注後キャップをして2~8 の冷蔵庫に保存した。

【0055】(4) 「抗原酵素複合体溶解液」の作製

500 μ LのTween-20 (和光純薬 化学用 CodeNo.160-11522) を4.5mlの蒸留水に溶解し、10% Tween-20溶液を作製する。Na₂HPO₄ · 12H₂O 13.26 g、NaH₂PO₄ · 2H₂O 2.02 g、NaCl 14.61 g、10%Tween-20溶液 10ml、スラオフ72N 200 μ Lを、蒸留水1Lに溶解後、その8mlを適切な容器に分注後キャップをして、2~8 の冷蔵庫に保存し

た。

【0056】(5) 「6倍濃縮洗浄液」の作製

20mlTween-20を200ml蒸留水に溶解し、10% Tween-20溶液を作製した。Dulbecco'sPBS(-) (和光 生化学用 CodeNo.041-20211) 12袋、スラオフ72N 0.3ml、10% Tween-20 30mlを1Lの蒸留水に溶解後、50mlずつ、適切な容器に分注後キャップをして、2~8 の冷蔵庫に保存した。

【0057】(6) 「発色基質溶液-A」の作製

5,5'-テトラメチルベンチジン (TMBZ 同仁化学 試験研究用 CodeNo.346-040301) 13.4mgを、ジメチルホルムアミド (DMF 和光純薬 試薬特級 CodeNo.045-02916) 1mlに溶解し、0.1 g/L Tween 20を含む0.1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.5)100mlと混合し、適切な褐色容器に10mlずつ分注後キャップをして、2~8 の冷蔵庫に保存した。

【0058】(7) 「発色基質溶液-B」の作製

30%過酸化水素水 (和光 試薬特級Code No. 081-04215) を蒸留水により0.1g/Lまで希釈し、適切な容器に5mlずつ分注後キャップをして、2~8 の冷蔵庫に保存した。

【0059】(8) 「発色停止液」の作製

1Nリン酸溶液を調製し、15mlずつ適切な容器に分注後キャップをして、室温で保存する。以上のようにして作製した(1)から(8)迄のキット構成成分を、箱詰めすることにより、EE2-ELISAキットが完成した。

【0060】実施例3 EE2-ELISA キットによる定量
実施例2により作成したEE2-ELISAキットを使用した定量法は下記の通りである。

(1) 「エチニルエストラジオール (EE2) 標準液」の調製

メタノールおよび蒸留水を用いてEE2標準原液 (0.1mg/L 10%メタノール溶液) を希釈し、必要な濃度 (例えば0, 0.05, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 μ g/L 10%メタノール中) のEE2標準液を調製する。

(2) 「抗原酵素複合体溶液」の調製

「抗原酵素複合体溶液」14 μ Lに、「抗原酵素複合体溶解液」7mLを加えて溶解し、「抗原酵素複合体溶液」を調製する。

(3) 「混合液」の調製

測定試料または「EE2標準液」(いずれも10%メタノール溶液) 100 μ L/wellと「抗原酵素複合体溶液」100 μ L/wellを「混合用マイクロプレート」上で混合する。

(4) 抗原抗体反応 (競合反応)

「抗EE2モノクローナル抗体固相化プレート」に(3)で調製した「混合液」を100 μ L/wellずつ分注し、室温で60分間反応させる。

(5) 「洗浄液」の調製

抗原抗体反応時間中に、「6倍濃縮洗浄液」と蒸留水を1:5の割合で混合し、「洗浄液」を調製する。

(6) 未反応物の除去
 抗原抗体反応液を捨て、「洗浄液」300μL/wellを用いてwell内を3回洗浄する。
 (7) 「発色試薬」の調製
 「発色基質溶液-A」と「発色基質溶液-B」を3:1の割合で混合し、「発色試薬」を調製する。
 (8) 発色反応/反応停止
 (7)で調製した「発色試薬」を100μL/well加え、室温で30分間反応させた後、「発色停止液」を100μL/well添加し反応を停止する。
 (9) 比色および濃度計算
 プレートリーダーを用い、波長450nmで吸光度を測定し、標準曲線から試料中のEE2濃度を算出する。
 【0061】実施例4 EE2-ELISA キットによる標準曲線の作成

*実施例3に従い作成した標準曲線を図1に示す。なお、EE2濃度を縦軸に、EE2濃度0μg/Lの時の吸光度と各濃度での吸光度の比率(阻害率、B/B0%)を横軸にプロットしている。この結果からEE2の定量可能範囲は0.05-3μg/L程度と考えられた。

【0062】実施例5 交差反応性試験

〔表2〕に示すエストロゲン類について実施例4と同様にそれぞれの標準曲線を作成し、阻害率=50%となるときのEE2濃度(IC₅₀)を求め下式により交差反応性を求めた結果を〔表2〕に示す。

$$\text{交差反応性}(\%) = \frac{\text{求めるエストロゲンのIC}_{50}}{\text{EE2のIC}_{50}} \times 100$$

【0063】

〔表2〕

EE2-227抗体の交差反応性*

エストロゲン類	交差反応性 (%)
エチニルエストラジオール (EE2)	100.0
エストロン (E1)	<0.2
2-メトキシ E1	<0.2
17β-エストラジオール (E2)	<0.2
E2-17-グルクロナイド	<0.2
E2-3-グルクロナイド	<0.2
E2-3-サルフェイト-17-グルクロナイド	<0.2
エストリオール (E3)	<0.2
16-エピ-E3	<0.2
E3-16-グルクロナイド	<0.2

【0064】抗EE2-227抗体はEE2に対する特異性が非常に高く、他のエストロゲン類とは殆ど反応しなかった。

【0065】実施例6 下水処理水測定におけるLC-MS/MSとELISA測定値の比較

下水処理水10Lについて、ガラス繊維ろ紙でろ過後、1M酢酸緩衝液(pH5.0)によりpHを5に調整した。ついでメタノール5ml、蒸留水10mlでコンディショニングしたC-18固相カートリッジに通水後、カートリッジを蒸留水、メタノール各5mlで洗浄した。EE2をC-18固相カートリッジからジクロロメタン5mlで溶出後、溶出液を窒素気流下(40℃)で蒸発乾固し、10%MeOHに溶解濃縮後、実施例-3による測定値の比較

*り、サンプル中のEE2濃度を定量した。なお、ELISA測定には市販のEE2用ELISAキット(R-Biopharm GmbH, German, #04330)も対照として用い、同封の操作説明書に従って定量した。また、同様に処理したサンプルについて、辻村らの方法(化学品検査協会創立50周年記念講演および第4回研究発表会講演要旨集、1999、17-26)によりLC-MS/MS分析を行い、ELISA測定値と比較した。結果を〔表3〕に示す。

【0066】

〔表3〕

方法	抗体取得方法	抗体	EE2濃度 (ng/L)	ELISA / LC 倍数
ELISA	本明細書記載法	EE2-227	0.26	1.2
ELISA	対照	市販キット	1.69	7.7
LCMS/MS			0.22	

【0067】本選択法により妨害物質耐性抗体として選択取得したEE2-227抗体を用いたELISAキットでの測定値はLC-MS/MS測定値と近似したが、本選択法を適用せず取得した抗体を使用した市販ELISAキットでの測定値はLC-MS/MSの約8倍となり、濃縮液中に存在する反応妨害物質の影響を受けているものと考えられた。

【0068】

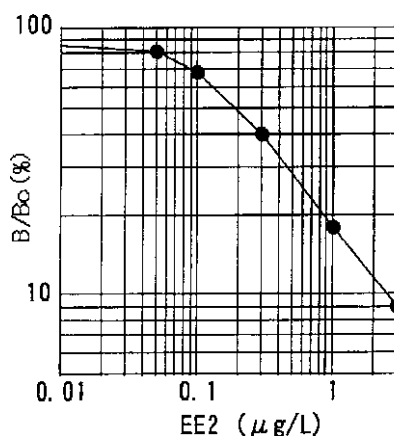
【発明の効果】本発明の方法により選別された抗原抗体反応妨害物質耐性抗体は、測定対象物を含む検体サンプル中に抗原抗体反応妨害物質が夾雑していても、それに影響されることなく測定対象物質を分析、測定することができ、また測定対象物質の濃縮にも利用することができる有用な抗体である。

50 【図面の簡単な説明】

【図1】 EE2-227抗体標準曲線

【図1】

EE2-227抗体標準曲線



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ド [*] (参考)
G 0 1 N 33/531		C 1 2 N 15/00	C
33/577		5/00	B

(72)発明者 小林 綾子
 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85
 号 武田薬品工業株式会社生活環境カンパ
 ニー内

(72)発明者 廣部 将人
 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85
 号 武田薬品工業株式会社生活環境カンパ
 ニー内

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA41 DA02 GA03 HA15
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
 4B065 AA92X AB05 AC14 CA25
 CA46
 4H045 AA11 AA20 AA30 DA76 EA50
 FA74

专利名称(译)	筛选抗体，杂交瘤，单克隆抗体及其用途的方法		
公开(公告)号	JP2003038173A	公开(公告)日	2003-02-12
申请号	JP2002141102	申请日	2002-05-16
申请(专利权)人(译)	武田化学工业有限公司		
[标]发明人	郷田泰弘 小林綾子 廣部将人		
发明人	郷田 泰弘 小林 綾子 廣部 将人		
IPC分类号	G01N33/531 C07K16/44 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/577		
FI分类号	C07K16/44 C12P21/08 G01N33/531.A G01N33/531.B G01N33/577.A C12N15/00.C C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/DA02 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2001149832 2001-05-18 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：通过选择几乎不受抗原 - 抗体反应抑制剂影响的抗体，提供一种抑制免疫测定方法中异常值产生的方法，该抗体 - 抗体反应抑制剂在进行时具有更高的样品共存可能性通过免疫测量方法进行分析 and 测量。解决方案：这种选择抗体的方法包括将测量对象的抗体固定在载体上，使抗原 - 酶复合物（标记的抗原），测量对象（抗原）和反应抑制剂与固定的抗体接触，添加酶底物以显色，从校准曲线计算抗原的量，并通过使用回收选择对抗原 - 抗体反应抑制剂具有抗性的抗体。

妨害物質の影響感度

測定対象	抗体	スクリーニング時 妨害物質有無	影響濃度 (ppm)			
			LAS	APE	AE	発見率 (%)
E E 2	EE2-227	有り	1000	1000	1000	100
	EE2-6	無し	10	10	10	10
E 2	E2-73	有り	1000	100	>1000	100
	E2-CC (市販キット)	無し	100	100	100	100
	E2-NG (市販キット)	無し	100	100	10	100
	E2-RB (市販キット)	無し	100	10	100	100
E 1	E1-420	有り	1000	100	>1000	10

市販キット略号

E2-CC (Estradiol Enzyme Immunoassay Kit, Cat#582251, Cayman Chemical Company, USA)

E2-NG (Estradiol ELISA Kit, Product #402110, Neogen Corporation, USA)

E2-RB (RIDASCREEN Estradiol, Cat#04031, R-Biopharm GmbH, Germany)