

(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2001 - 255324

(P2001 - 255324A)

(43)公開日 平成13年9月21日(2001.9.21)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コード (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	G 4 B 0 2 4 J 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		C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5
15/02		G 0 1 N 33/531	A

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 12数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 66367(P2000 - 66367)

(22)出願日 平成12年3月10日(2000.3.10)

(71)出願人 595181874

株式会社環境免疫技術研究所
東京都港区芝浦4丁目9番25号

(72)発明者 伊東 茂壽

東京都港区浜松町1丁目27番14号 株式会社
環境免疫技術研究所内

(72)発明者 金井 正三

東京都港区浜松町1丁目27番14号 株式会社
環境免疫技術研究所内

(74)代理人 100089705

弁理士 社本 一夫 (外 5 名)

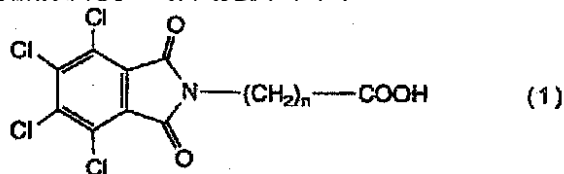
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 フサライドの抗体及び測定方法

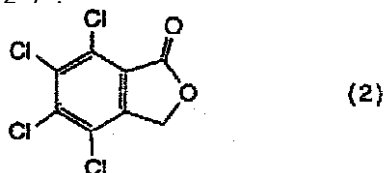
(57)【要約】 (修正有)

【課題】 いもち病専用の防除剤であるフサライドの免疫化学的測定方法の提供。

【解決手段】 以下の式(1) :



[式(1)中、nは1 - 10の整数である。] で表される構造を有する化合物と高分子化合物を結合させることにより抗原を作製し、当該抗原を用いることにより、以下の式(2) :



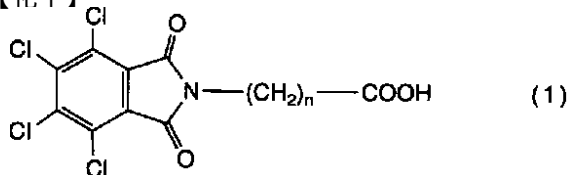
で表される構造を有する化合物、すなわちフサライドに反応性を示す抗体を製造することを特徴とする、式

(2) で表される構造を有する化合物に反応性を示す抗体又はそのフラグメントの製造方法。上記抗体又はフラグメントを用いるフサライドの免疫化学的測定方法。

【特許請求の範囲】

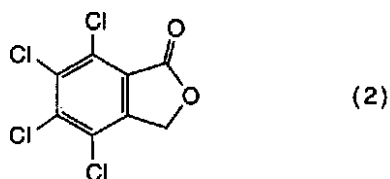
【請求項1】以下の式(1)：

【化1】



[式(1)中、nは、1 - 10の整数である]で表される構造を有する化合物と高分子化合物を結合させることにより抗原を作製し、当該抗原を用いることにより、以下の式(2)：

【化2】



で表される構造を有する化合物に反応性を示す抗体を製造することを特徴とする、式(2)で表される構造を有する化合物に反応性を示す抗体又はそのフラグメントの製造方法。

【請求項2】請求項1に記載の方法により製造された、式(2)で表される構造を有する化合物に反応性を示す抗体又はそのフラグメント。

【請求項3】モノクローナル抗体である、請求項2に記載の抗体又はフラグメント。

【請求項4】寄託番号FERM P - 17740で寄託されているハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体FLD1F9である、請求項2若しくは3に記載の抗体又はフラグメント。

【請求項5】請求項2ないし4のいずれか1項に記載の抗体又はフラグメントを産生するハイブリドーマ。

【請求項6】寄託番号FERM P - 17740で寄託されている、請求項5に記載のハイブリドーマ。

【請求項7】請求項2ないし4のいずれか1項に記載の抗体又はフラグメントを用いることを特徴とする、式(2)で表される構造を有する化合物の免疫化学的測定方法。

【請求項8】さらに、請求項1において式(1)で表される構造を有する化合物、および/又は、請求項1において式(1)で表される化合物と高分子化合物若しくは標識物質との結合体を用いることを含む、請求項7に記載の免疫化学的測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、4,5,6,7-テトラクロロフタリド(以下、本明細書中「フサライド」と言う)のハブテン化合物、抗原、抗体及びそのフラグメントに関する。

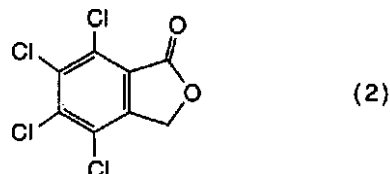
【0002】本発明はさらに、前記抗原、抗体及びそのフラグメントを用いた免疫化学的測定方法に関する。

【0003】

【従来の技術】フサライドは、以下の式(2)：

【0004】

【化3】



【0005】で表される構造を有する殺菌剤である。詳細には、フサライドはいもち病専用の防除剤で、予防効果があり、残効の長い特徴がある。作用機構としては、in vitroの抗菌力はなく、in vivoでイネいもち病菌付着器の稲体への侵入能を特異的に阻害する。この作用はメラニン合成系の阻害に基づくことが最近明らかにされた。耐雨性があり、予防効果並びに浸透移行性も認められている(農薬ハンドブック 第246頁 - 第247頁及び第666頁 1998年版 (社)日本植物防疫協会)。

【0006】近年、土壌、水、大気等の環境中での残留農薬や、最近特に増加してきた輸入農産物のポストハーベスト農薬等の残留に大きな社会的関心が寄せられている。フサライドについては、農薬登録保留基準が、米で1ppmと定められている。また、水に関する基準についても、公共用水域等に関する基準値が0.1mg/mlと定められている(最新 農薬の規制・基準値便覧、1995年版、第298頁、(社)日本植物防疫協会)。よって、環境や食品に関する安全確保のためには、これらに含有される、フサライドの量を迅速かつ正確に測定することが必要である。

【0007】従来、例えば農作物中のフサライドは米から抽出し、精製した後、ガスクロマトグラフィー(GC)により分析されてきた。即ち、例えば、試料をアセトンで抽出し、多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィー(CC)で精製後、ヘキサソール - アセトニトリル分配してアセトニトリル層を濃縮乾固し、さらにシリカゲルCCで精製後、GCで測定する方法等が採用されている(「最新 農薬の残留分析法」 第334頁 - 第235頁、中央法規出版 1995年4月1日発行)。これらの方法は、試料の調製が煩雑で多大の手順と時間を必要とし、分析に熟練を要すること、並びに、測定装置や設備等に高額な費用を必要とする等の問題点がある。フサライドの測定は短時間で膨大な数の試料の分析結果を出す必要があり、精度面だけでなく、簡便性、迅速性及び経済性をも具備した新規測定方法が要求されてきている。

【0008】免疫化学的測定方法は、抗体が抗原を特異的に認識する抗原抗体反応に基づいて抗原や抗体の検出

を行う方法であり、その優れた精度、簡便性、迅速性、経済性から近年注目を集めてきている。免疫化学的測定方法においては検出方法として非常に多種の標識、例えば、酵素、放射性トレーサー、化学発光あるいは蛍光物質、金属原子、ゾル、ラテックス及びバクテリオファージが適用されてきた。

【0009】免疫化学的測定方法の中でも、酵素を使用する酵素免疫測定法(EIA)は経済性・利便性から特に優れたものとして広く使用されるに至っている。酵素免疫測定法についての優れた論評が、Tijssen P, "Practice and theory of enzyme immunoassays" in Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, Elsevier Amsterdam New York, Oxford ISBN 0-7204-4200-1(1990)に記載されている。

【0010】一般に、分子量が大きな分子については、それ以上修飾することなく動物に接種することにより、適当な免疫反応を惹起し、抗原を認識する抗体を産生させることができる。しかし、フサライドのような低分子化合物は通常動物に接種したとき免疫応答を引き出すことができない。これらの分子は免疫原性を有する高分子化合物(タンパク質や多糖類など)に結合させることによって初めて一団のエピトープとして行動し、T細胞受容体の存在下で免疫応答を起こし、その結果、一群のBリンパ球により抗体が産生される。このように高分子化合物と結合させて初めて免疫原性を生じる分子を総称して「ハプテン」と言う。

【0011】しかし、低分子化合物を高分子化合物と結合させたものを抗原としても、得られた抗体は望む分子を認識しないか、あるいはごく低い親和性しかもたない場合がしばしばある。そのため、一般に低分子化合物そのものではなく、結合に利用できる官能基と共にスペーサーアーム(結合手)を導入したものをハプテンとして使用する必要がある。しかしその場合に、結合手/官能基の配置、結合手の大きさ等の全ての問題を考慮して導入が適切に行われたものを使用しないと、好ましい抗体は得られない。適切な導入は個々の分子に応じて工夫しなければならない。

【0012】フサライドについては、その必要性が非常に高かったにもかかわらず、適切な抗体はもとより、そのような抗体を作製するためのハプテンも本発明前には得られていなかった。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、フサライドに反応する新規な抗体若しくはそのフラグメント、及びその作製方法を提供することを目的とする。尚、本明細書において抗体の「フラグメント」とは、抗原と結合可

*能な抗体の一部分、例えばF_{a,b}断片等を意味する。

【0014】本発明はその一態様において、フサライドに反応性を有するモノクローナル抗体を提供する。

【0015】本発明は、また、フサライドに反応性を有する新規な抗体を作製するための抗原を構成するハプテン化合物(フサライドハプテン)を提供することを目的とする。

【0016】本発明は、さらに、フサライドハプテンと高分子化合物との結合体を提供することを目的とする。

【0017】本発明は、さらにまた、前記抗体又はそのフラグメントを産生するハイブリドームを提供することを目的とする。

【0018】本発明は、さらに、前記抗体若しくはそのフラグメント及び/又は前記フサライドハプテンと高分子化合物若しくは標識物質との結合体を使用することを含む、フサライドの免疫化学的測定方法を提供することを目的とする。

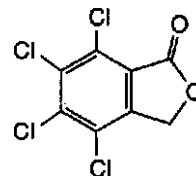
【0019】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、フサライド又はその部分にスペーサーアーム及び高分子化合物との結合に利用できる官能基を導入した、フサライドの誘導体をハプテンとして使用することにより、前記化合物に反応性を有する抗体を得ることに成功し、本発明の完成に至った。

【0020】本発明の対象となるフサライドは、以下の式(2)：

【0021】

【化4】

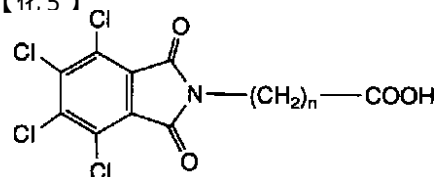


(2)

【0022】で表される構造を有する化合物である。本発明の抗体は、例えば、フサライドの一部分にスペーサーアーム及び結合に利用できる官能基を導入した誘導体をハプテンとして適当な高分子化合物と結合させたものを抗原として用いることによって得ることができる。例えば、以下の式(1)：

【0023】

【化5】



(1)

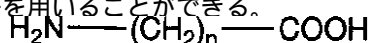
【0024】[式(1)中、nは1-10の整数である]で表される構造を有する化合物を、抗体作製のためのハプテンとして使用する。

【0025】式(1)中、好ましくは、nは5である。

なお、式(1)のハブテン化合物において窒素原子を含む5員の複素環は2個の酸素で置換されているが、対象化合物のフサライドと同様に1個の酸素で置換されていてもよい。

【0026】本発明は、前記ハブテン化合物、ハブテン化合物と高分子化合物との結合体、フサライドに反応する抗体及びその作製方法、並びに該ハブテン化合物又は該抗体を用いるフサライドの免疫化学的測定方法に関する。

【0027】フサライドハブテンの作製
式(1)で表されるフサライドハブテンは、公知の方法に従って製造することができる。限定するわけではないが、例えば以下のような方法を用いることができる。



【0032】[式(X2)中、nは1-10の整数である]で表される構造を有するアミノカルボン酸を反応させて、式(1)の化合物を得ることができる。

【0033】反応は、0 から溶媒の沸点の温度、好ましくは50 から150 で、5分から15時間、好ましくは30分から4時間行う。反応は通常無溶媒で行うが、トルエン、キシレン、N,N-ジメチルホルムアミド等の不活性溶媒中で行ってもよい。

【0034】なお、式(X1)の化合物は市販されているものを使用することができる。あるいは、公知の方法を用いて市販の化合物より合成することも可能である。

【0035】上述したような製造方法によって得られた化合物を、必要に応じシリカゲルクロマトグラフィー又は再結晶操作等を行うことにより、さらに高純度の精製品とすることができる。

【0036】以下、本発明の抗原、抗体の作製、及び免疫化学的測定法について説明する。尚、これらの調製は公知の方法、例えば続生化学実験講座、免疫生化学研究法(日本生化学会編)等に記載の方法に従って行うことができる。

【0037】フサライドハブテンと高分子化合物との結合体の作製

上述のように合成されたフサライドハブテンを適当な高分子化合物に結合させてから免疫用抗原若しくは固相化用抗原として使用する。

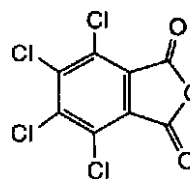
【0038】好ましい高分子化合物の例としては、スカシガイヘモシアニン(以下、「KLH」と言う)、卵白アルブミン(以下、「OVA」と言う)、ウシ血清アルブミン(以下、「BSA」と言う)、ウサギ血清アルブミン(以下、「RSA」と言う)などがある。KLH及びBSAが好ましい。

【0039】フサライドハブテンと高分子化合物との結合は、例えば、混合酸無水物法(B.F.Erlanger et al.: J. Biol. Chem. 234 1090 1094 (1954))、又は活性化エステル法(A.E.KARU et al.: J. Agri 50

【0028】例えば、以下の式(X1)：

【0029】

【化6】



(X1)

【0030】で表される構造を有する無水テトラクロロ

10 フタル酸に、以下の式(X2)：

【0031】

【化7】

(X2)

c. Food Chem. 42 301-309 (1994))等の公知の方法によって行うことができる。

【0040】混合酸無水物法において用いられる酸無水物は、通常のショッテン-バウマン反応により得られ、これを高分子化合物と反応させることにより目的とするハブテン-高分子化合物結合体が製造される。ショッテン-バウマン反応は塩基性化合物の存在下に行われる。塩基性化合物としては、ショッテン-バウマン反応に慣用の化合物を使用することができ、例えば、トリブチルアミン、トリエチルアミン、トリメチルアミン、N-メチルモルホリン、ピリジン、N,N-ジメチルアニリン、DBN、DBU、DABCO等の有機塩基、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素ナトリウム等の無機塩基等が挙げられる。該反応は、通常マイナス20 から150、好ましくは0 から100において行われ、反応時間は5分から10時間、好ましくは5分から2時間である。得られた混合酸無水物と高分子化合物との反応は、通常マイナス20 から100、好ましくは0 から50において行われ、反応時間は5分から10時間、好ましくは5分から5時間である。混合酸無水物法は一般に溶媒中で行われる。溶媒としては、混合酸無水物法に慣用されているいずれの溶媒も使用可能であり、具体的にはジオキサン、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジメトキシエタン等のエーテル類、ジクロロメタン、クロロホルム、ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素類、酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ヘキサメチルリン酸トリアミド等の非プロトン性極性溶媒等が挙げられる。混合酸無水物法において使用されるハロ蟻酸エステルとしては、例えばクロロ蟻酸メチル、プロモ蟻酸メチル、クロロ蟻酸エチル、プロモ蟻酸エチル、クロロ蟻酸イソブチル等が挙げられる。当該方法におけるハブテンとハロ蟻酸エステルと高分子化合物の使用割合は、広い範囲から適宜選択され得る。

【0041】一方、活性化エステル法は、一般に以下のように行うことができる。まず、ハプテン化合物を有機溶媒に溶解し、カップリング剤の存在下にてN-ヒドロキシこはく酸イミドと反応させ、N-ヒドロキシこはく酸イミド活性化エステルを生成させる。

【0042】カップリング剤としては、縮合反応に慣用されている通常のカップリング剤を使用でき、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド、カルボニルジイミダゾール、水溶性カルボジイミド等が含まれる。有機溶媒としては、例えば、ジメチルスルホキシド（以下、「DMSO」と言う）、N,N-ジメチルホルムアミド（以下、「DMF」と言う）、ジオキサン等が使用できる。反応に使用するハプテン化合物とN-ヒドロキシこはく酸イミドのモル比は好ましくは1:10から10:1、より好ましくは1:1から1:10、最も好ましくは1:1である。反応温度は、0 から100、好ましくは5 から50、より好ましくは22 から27で、反応時間は5分から24時間、好ましくは30分から6時間、より好ましくは1時間から2時間である。

【0043】カップリング反応後、反応液を高分子化合物を溶解した溶液に加え反応させると、例えば高分子化合物が遊離のアミノ基を有する場合、当該アミノ基とハプテン化合物のカルボキシル基の間に酸アミド結合が生成される。反応温度は、0 から60、好ましくは5 から40、より好ましくは22 から27で、反応時間は5分から24時間、好ましくは1時間から16時間、より好ましくは1時間から2時間である。反応物を、透析、脱塩カラム等によって精製して、フサライドハプテンと高分子化合物との結合体を得ることができる。

【0044】また、上記と同様の方法により、酵素等の標識物質をフサライドハプテンに結合させたものを、免疫化学的測定方法において使用することができる。標識物質としては、西洋わさびペルオキシダーゼ（以下「HRP」と言う）、アルカリフォスファターゼ等の酵素、フルオレセインイソシアネート、ローダミン等の蛍光物質、³²P、¹²⁵I等の放射性物質、化学発光物質などがある。

【0045】ポリクローナル抗体の作製

フサライドハプテンと高分子化合物との結合体を使用して、常法により本発明のポリクローナル抗体を作製することができる。例えば、フサライドハプテンとKLHとの結合体をリン酸ナトリウム緩衝液（以下、「PBS」と言う）に溶解し、フロイント完全アジュバント又は不完全アジュバント、あるいはミョウバン等の補助剤と混合したものを、免疫用抗原として動物に免疫することによって得ることができる。免疫される動物としては当該分野で常用されるものをいずれも使用できるが、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等を挙げることができる。ただし、ヒトは含まれない。

【0046】免疫の際の投与法は、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注射、皮内注射、筋肉内注射のいずれでもよいが、皮下注射又は腹腔内注射が好ましい。免疫は1回又は適当な間隔で、好ましくは1週間ないし5週間の間隔で複数回行うことができる。

【0047】免疫した動物から血液を採取し、そこから分離した血清を用い、フサライドと反応するポリクローナル抗体の存在を評価することができる。

【0048】モノクローナル抗体の作製

フサライドハプテンと高分子化合物との結合体を使用して、公知の方法により本発明のモノクローナル抗体を作製することができる。

【0049】モノクローナル抗体の製造にあたっては、少なくとも下記のような作業工程が必要である。

(a) 免疫用抗原として使用するフサライドハプテンと高分子化合物との結合体の作製

(b) 動物への免疫

(c) 血液の採取、アッセイ、及び抗体産生細胞の調製

(d) ミエローマ細胞の調製

(e) 抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合とハイブリドーマの選択的培養

(f) 目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングと細胞クローニング

(g) ハイブリドーマの培養又は動物へのハイブリドーマの移植によるモノクローナル抗体の調製

(h) 調製されたモノクローナル抗体の反応性の測定等モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製するための常法は、例えば、ハイブリドーマ テクニクス (Hybridoma Techniques), コールド スプリング ハーバー ラボラトリーズ (Cold Spring Harbor Laboratory, 1980年版)、細胞組織化学 (山下修二ら、日本組織細胞化学会編; 学際企画、1986年) に記載されている。

【0050】以下、本発明のフサライドに対するモノクローナル抗体の作製方法を説明するが、これに制限されないことは当業者によって明らかであろう。

【0051】(a) - (b) の工程は、ポリクローナル抗体に関して記述した方法とほぼ同様の方法によって行うことができる。

【0052】(c) の工程における抗体産生細胞はリンパ球であり、これは一般には脾臓、胸腺、リンパ節、末梢血液又はこれらの組み合わせから得ることができるが脾細胞が最も一般的に用いられる。従って、最終免疫後、抗体産生が確認されたマウスより抗体産生細胞が存在する部位、例えば脾臓を摘出し、脾細胞を調製する。

【0053】(d) の工程に用いることのできるミエローマ細胞としては、例えば、Balb/cマウス由来骨髄腫細胞株のP3/X63-Ag8(X63) (Nature, 256, 495-497 (1975))、P3

/X63-Ag8.U1(P3U1)(Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7(1987)), P3/NSI-1-Ag4-1(NS-1)(Eur. J. Immunol., 6, 511-519(1976)), Sp2/0-Ag14(Sp2/0)(Nature, 276, 269-270(1978)), FO(J. Immunol. Meth., 35, 1-21(1980)), MPC-11, X63.653, S194等の骨髓腫株化細胞、あるいはラット由来の210.RCY3.Ag1.2.3.(Y3)(Nature, 277, 131-133, (1979))等を使用できる。

【0054】上述したミエローマ細胞をウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)又はイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)で継代培養し、融合当日に約 1×10^6 以上の細胞数を確保する。

【0055】(e)の工程の細胞融合は公知の方法、例えばミルスタイン(Milstein)らの方法(Methods in Enzymology, 73, 3(1981))等に準じて行うことができる。現在最も一般的に行われているのはポリエチレングリコール(PEG)を用いる方法である。PEG法については、例えば、細胞組織化学、山下修二ら(上述)に記載されている。別の融合方法としては、電気処理(電気融合)による方法を採用することもできる(大河内悦子ら、実験医学 5.1315-19, 1987)。その他の方法を適宜採用することもできる。また、細胞の使用比率も公知の方法と同様でよく、例えばミエローマ細胞に対して脾細胞を3倍から10倍程度用いればよい。

【0056】脾細胞とミエローマ細胞とが融合し、抗体分泌能及び増殖能を獲得したハイブリドーマ群の選択は、例えば、ミエローマ細胞株としてヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジンを使用した場合、例えば上述のDMEMやIMDMにヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジンを添加して調製したHAT培地の使用により行うことができる。

【0057】(f)の工程では、選択されたハイブリドーマ群を含む培養上清の一部をとり、例えば後述するELISA法により、フサライドに対する抗体活性を測定する。

【0058】さらに、測定によりフサライドに反応する抗体を産生することが判明したハイブリドーマの細胞クローニングを行う。この細胞クローニング法としては、限界希釈により1ウェルに1個のハイブリドーマが含まれるように希釈する方法「限界希釈法」；軟寒天培地上に撒きコロニーをとる方法；マイクロマニピュレーターによって1個の細胞を取り出す方法；セルソーターによって1個の細胞を分離する「ソータークローン法」等が挙げられる。限界希釈法が簡単であり、よく用いられ

る。

【0059】抗体価の認められたウェルについて、例えば限界希釈法によりクローニングを1-4回繰り返して安定して抗体価の得られたものを、抗フサライドモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。ハイブリドーマを培養する培地としては、例えば、ウシ胎児血清(FCS)を含むDMEM又はIMDM等が用いられる。ハイブリドーマの培養は、例えば二酸化炭素濃度5-7%程度及び37(100%湿度の恒温器中)で培養するのが好ましい。

【0060】(g)の工程で抗体を調製するための大量培養は、フォローファイバー型の培養装置等によって行われる。又は、同系統のマウス(例えば、上述のBalb/c)あるいはNu/Nuマウスの腹腔内でハイブリドーマを増殖させ、腹水液より抗体を調製することも可能である。

【0061】これらにより得られた培養上清液あるいは腹水液を抗フサライドモノクローナル抗体として使用することができるが、さらに透析、硫酸アンモニウムによる塩析、ゲル濾過、凍結乾燥等を行い、抗体画分を集め精製することにより抗フサライドモノクローナル抗体を得ることができる。さらに、精製が必要な場合には、イオン交換カラムクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)などの慣用されている方法を組み合わせることにより実施できる。

【0062】以上のようにして得られた抗フサライドモノクローナル抗体は、例えばELISA法などの公知の方法を使用して、サブクラス、抗体価等を決定することができる。

【0063】抗体によるフサライドの測定

本発明で使用する抗体によるフサライドの測定法としては、放射性同位元素免疫測定法(RIA法)、ELISA法(Engvall, E., Methods in Enzymol., 70, 419-439(1980))、蛍光抗体法、プラーク法、スポット法、凝集法、オクタロニー(Ouchterlony)等の一般に抗原の検出に使用されている種々の方法(「ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体」、株式会社R&Dプランニング発行、第30頁-第53頁、昭和57年3月5日)が挙げられる。感度、簡便性等の観点からELISA法が汎用されている。

【0064】フサライドの測定は、各種ELISA法のうち例えば間接競合ELISA法により、以下のような手順により行うことができる。

【0065】(a)まず、固相化用抗原であるフサライドハプテンと高分子化合物との結合体を担体に固相化する。

【0066】(b)固相化用抗原が吸着していない固相表面を抗原と無関係な物質、例えばタンパク質によりブ

ロッキングする。

【0067】(c)これに各種濃度のフサライドを含む試料及び抗体を加え、該抗体を前記固相化抗原及びフサライドに競合的に反応させて、固相化抗原-抗体複合体及び、フサライド-抗体複合体を生成させる。

【0068】(d)固相化抗原-抗体複合体の量を測定することにより、予め作成した検量線から試料中のフサライドの量を決定することができる。

【0069】(a)工程において、固相化用抗原を固相化する担体としては、特別な制限はなく、ELISA法において常用されるものをいずれも使用することができる。例えば、ポリスチレン製の96ウェルのマイクロタイタープレートが挙げられる。

【0070】固相化用抗原を担体に固相化させるには、例えば、固相化用抗原を含む緩衝液を担体上に載せ、インキュベーションすればよい。緩衝液としては公知のものが使用でき、例えば、リン酸緩衝液を挙げることができる。緩衝液中の抗原の濃度は広い範囲から選択できるが、通常 $0.01\mu\text{g}/\text{ml}$ から $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度、好ましくは $0.05\mu\text{g}/\text{ml}$ から $5\mu\text{g}/\text{ml}$ が適している。また、担体として96ウェルのマイクロタイタープレートを使用する場合には、 $300\mu\text{l}/\text{ウェル}$ 以下で $20\mu\text{l}/\text{ウェル}$ から $150\mu\text{l}/\text{ウェル}$ 程度が望ましい。更に、インキュベーションの条件にも特に制限はないが、通常4程度で一晩インキュベーションが適している。

【0071】なお、担体に固相化させる抗原としては、抗体を作製したフサライドハプテンと高分子化合物との結合体自体のみならず、式(1)で表される他のハプテンと高分子化合物との結合体を固相化抗原として使用することも可能である。例えば、式(1)においてnが抗体作製用と相違する化合物を、固相化抗原として使用することもできる。さらに、式(1)に含まれない他のフサライドを固相化抗原として使用することも可能である。

【0072】(b)工程のブロッキングは、抗原(フサライドハプテンと高分子化合物との結合体)を固相化した担体において、フサライドハプテン部分以外に後で添加する抗体が吸着され得る部分が存在する場合があり、もっぱらそれを防ぐ目的で行われる。ブロッキング剤として、例えば、BSAやスキムミルク溶液を使用できる。あるいは、ブロックエース(「Block Ace」、雪印乳業社製、コードNo. UK-25B)等のブロッキング剤として市販されているものを使用することもできる。具体的には、限定されるわけではないが、例えば抗原を固相化した部分にブロッキング剤を含む緩衝液[例えば、1%BSAと60mM NaClを添加した85mM ホウ酸緩衝液(pH8.0)]を適量加え、約4で、1時間ないし5時間インキュベーションした後、洗浄液で洗浄することにより行われる。洗浄液

としては特に制限はないが、例えば、PBSを用いることができる。

【0073】次いで(c)工程において、フサライドを含む試料と抗体を固相化抗原と接触させ、抗体を固相化抗原及びフサライドと反応させることにより、固相化抗原-抗体複合体及びフサライド-抗体複合体が生成する。

【0074】この際、抗体としては、第一抗体として本願発明のフサライドに対する抗体を加え、更に第二抗体として標識酵素を結合した第一抗体に対する抗体を順次加えて反応させる。

【0075】第一抗体は緩衝液に溶解して添加する。限定されるわけではないが、反応は、10から40、好ましくは約25で約1時間行えばよい。反応終了後、緩衝液で担体を洗浄し、固相化抗原に結合しなかった第一抗体を除去する。洗浄液としては、例えば、PBSを用いることができる。

【0076】次いで第二抗体を添加する。例えば第一抗体としてマウスモノクローナル抗体を用いる場合、酵素(例えば、ペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼ等)を結合したマウス抗体に対する抗体を用いるのが適当である。担体に結合した第一抗体に好ましくは最終吸光度が4以下、より好ましくは0.5-3.0となるように希釈した第二抗体を反応させるのが望ましい。希釈には緩衝液を用いる。限定されるわけではないが、反応は室温で約1時間行い、反応後、緩衝液で洗浄する。以上の反応により、第二抗体が第一抗体に結合する。また、標識した第一抗体を用いてもよく、その場合、第二抗体は不要である。

【0077】次いで(d)工程において担体に結合した第二抗体の標識物質と反応する発色基質溶液を加え、吸光度を測定することによって検量線からフサライドの量を算出することができる。

【0078】第二抗体に結合する酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、例えば、過酸化水素、並びに3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン又はo-フェニレンジアミン(以下、「OPD」と言う)を含む発色基質溶液を使用することができる。限定されるわけではないが、発色基質溶液を加え室温で約10分間反応させた後、1Nの硫酸を加えることにより酵素反応を停止させる。3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンを使用する場合は、450nmの吸光度を測定する。OPDを使用する場合は、492nmの吸光度を測定する。一方、第二抗体に結合する酵素としてアルカリホスファターゼを使用する場合には、例えばp-ニトロフェニルリン酸を基質として発色させ、2NのNaOH溶液を加えて酵素反応を止め、415nmでの吸光度を測定する方法が適している。

【0079】フサライドを添加しない反応溶液の吸光度に対して、それらを添加して抗体と反応させた溶液の吸

光度の減少率を阻害率として計算する。既知の濃度のフサライドを添加した反応液の阻害率により予め作成しておいた検量線を用いて、試料中のフサライドの濃度を算出できる。

【0080】あるいはフサライドの測定は、例えば以下に述べるような本発明のモノクローナル抗体を用いた直接競合ELISA法によって行うこともできる。

【0081】(a) まず、本発明のモノクローナル抗体を、担体に固相化する。

(b) 抗体が固相化されていない担体表面を抗原と無関係な物質、例えばタンパク質により、ブロッキングする。

【0082】(c) 上記工程とは別に、各種濃度のフサライドを含む試料に、フサライドハプテンと酵素を結合させた酵素結合ハプテンを加えた混合物を調製する。

【0083】(d) 上記混合物を上記抗体固相化担体と反応させる。

(e) 固相化抗体 - 酵素結合ハプテン複合体の量を測定することにより、あらかじめ作成した検量線から試料中のフサライドの量を決定する。

【0084】(a) 工程においてモノクローナル抗体を固相化する担体としては、特別な制限はなくELISA法において常用されるものを用いることができ、例えば96ウェルのマイクロタイタープレートが挙げられる。モノクローナル抗体の固相化は、例えばモノクローナル抗体を含む緩衝液を担体上にのせ、インキュベートすることによって行える。緩衝液の組成・濃度は前述の間接競合ELISA法と同様のものを採用できる。

【0085】(b) 工程のブロッキングは、抗体を固相化した担体において、後に添加する試料中のフサライド並びに酵素結合ハプテンが、抗原抗体反応とは無関係に吸着される部分が存在する場合があるので、それを防ぐ目的で行う。ブロッキング剤及びその方法は、前述の間接競合ELISA法と同様のものを使用できる。

【0086】(c) 工程において用いる酵素結合ハプテンの調製は、フサライドハプテンを酵素に結合する方法であれば特に制限なく、いかなる方法で行ってもよい。例えば、前述した活性化エステル法を採用することができる。調製した酵素結合ハプテンは、フサライドを含む試料と混合する。

【0087】なお、酵素等の標識物質に結合させるハプテンとしては、間接競合ELISA法における固相化抗原の場合と同様に、抗体作製に使用したフサライドハプテン自体のみならず、式(1)で表される他のハプテンと高分子化合物との結合体を標識用抗原として使用することも可能である。例えば、式(1)においてnが抗体作製用と相違する化合物を、標識用抗原として使用する

こともできる。さらに、式(1)に含まれない他のフサライドも、標識用抗原として使用可能である。

【0088】(d) 工程においてフサライドを含む試料及び酵素結合ハプテンを抗体固相化担体に接触させ、フサライドと酵素結合ハプテンとの競合阻害反応により、これらと固相化抗体との複合体が生成する。フサライドを含む試料は適当な緩衝液で希釈して使用する。限定されるわけではないが、反応は例えば、室温でおよそ1時間行う。反応終了後、緩衝液で担体を洗浄し、固相化抗体と結合しなかった酵素結合ハプテンを除去する。洗浄液は例えばPBSを使用することができる。

【0089】さらに、(e) 工程において酵素結合ハプテンの酵素に反応する発色基質溶液を前述の間接競合ELISA法と同様に加え、吸光度を測定することにより検量線からフサライドの量を算出することができる。

【0090】本発明のモノクローナル抗体FLD1F9は、直接競合ELISA法で約0.5 ng/mlないし約1000 ng/ml、好ましくは約1.0 ng/mlないし約100 ng/mlの濃度範囲でフサライドと反応する。さらに、約1.0 ng/mlないし約1000 ng/ml、好ましくは約1.0 ng/mlないし約100 ng/mlの濃度範囲でクロロタロニルとも反応する。(実施例8、図1)。

【0091】さらに前述したように直接競合ELISA法において抗体作製用と異なるハプテンを標識用抗原として使用でき、その組み合わせによって直接競合ELISA法において固有の反応性を示す。

【0092】本発明の抗体の交差反応性

上述した直接競合ELISA法又は間接競合ELISA法により、本発明のモノクローナル抗体の交差反応性を調べることができる。

【0093】例えば、モノクローナル抗体FLD1F9は他のフサライド類似化合物のクロロタロニルに約27%の交差反応性を有し、他のキントゼン、CNPには反応性を示さない。よって、フサライド並びにクロロタロニルに対して高い特異性を有する。(実施例9、図2)。

【0094】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の技術的範囲を制限するためのもではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾、変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

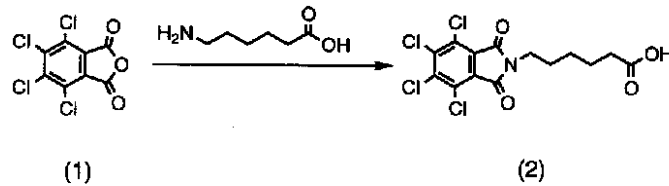
【0095】

【実施例】実施例1 フサライドハプテンの合成

【0096】

【化8】

反応式



【0097】6-(3,4,5,6-テトラクロロフタルイミド)ヘキサン酸(2)の合成

無水テトラクロロフタル酸(1) 1.4 g (5.0 mmol)と6-アミノヘキサン酸0.72 g (5.5 mmol)の混合物を70℃で3時間撹拌した。反応混合物を加温下で30 mlの酢酸に溶かし、濾過した。濾液を室温まで冷やし、析出した固体を濾取した。固体をエタノールで再結晶化し1.1 g (収率55%)の目的化合物(2)を得た。融点: 241-242℃ 上記フサライドハプテン(2)の¹H-NMRによる物性データ(ケミカルシフト)を以下に示す。

【0098】

【表1】

¹H-NMR (DMSO-D₆, 400 MHz)
 1.29 (2H, m, CH₃), 1.55 (4H, m, 2CH₂), 2.19 (2H, t, CH₂), 3.55 (2H, t, CH₂), 11.99 (1H, s, COOH)

実施例2 免疫用抗原の作製

免疫用抗原としてフサライドハプテンとKLHとの結合体を以下のように混合酸無水物法を用いて作製した。

【0099】実施例1で作製したフサライドハプテンの7 mgを無水ジオキサン0.7 mlに溶解し、10℃ないし12℃に冷却した後、トリ-N-ブチルアミン4 μlおよびククロロ蟻酸イソブチル24 μlを添加し、10~12℃にて30分間撹拌した(以下これを「A液」という)。

【0100】一方、蒸留水1 mlにKLHを20 mg溶解し、0.5% NaHCO₃ pH9.4を外液として一晚透析した。透析後3000 rpm、30分間遠心し得られた上清1.5 mlにA液をゆっくり添加した。4℃にて2時間反応させた後、スパーテル1杯のグリシンを添加してさらに4℃にて30分間撹拌することにより反応を終了させた。この反応液を145 mM NaCl-10 mM PBS (pH7.4)中で1週間透析し、フサライドハプテンとKLHとの結合体(以下、「フサライドハプテン/KLH」と言う)を調製した。以下、免疫用抗原として用いた。

【0101】実施例3 スクリーニング用抗原の作製
 実施例2と同様の方法を用いて、フサライドハプテンとBSAとの結合体(以下、「フサライド/BSA」と言う)を作製し、スクリーニング用抗原として用いた。

【0102】実施例4 免疫感作

免疫にはBalb/cマウスを用いた。実施例2で作製したフサライド/KLH(免疫用抗原)100 μgをPBS 100 μlに溶解し、等量のフロイント完全アジュバントと混合した後、Balb/cマウスに接種した。初回免疫後14日目、31日目、58日目、79日目にフロイント不完全アジュバントを用いて前記と同様の操作により調製した免疫用抗原を、マウスに追加免疫した。また、115日後にはPBSに溶解した免疫抗原をマウスに追加免疫した。122日後に免疫したマウスの尾静脈より採血を行い、血清を分離しこれを抗血清とした。

【0103】実施例5 抗血清のフサライドに対する反応性

実施例3で調製したスクリーニング用抗原(フサライドハプテン/BSA)を用い、間接競合ELISA法により、実施例4で調製した抗血清のフサライドに対する反応性を調べた。

【0104】まず、実施例3で調製したフサライドハプテン/BSAのPBS溶液(5 μg/ml)を100 μl/ウェルにて96ウェルプレートにコーティングした(0.5 μg/100 μl/ウェル)。PBSで洗浄の後、4倍に希釈したブロックエース(「Block Ace」:大日本製薬、コードNo. UK-25B)でブロッキングした後、抗血清の1000倍希釈液と各種濃度のフサライドあるいはその類似化合物を含む10%メタノール溶液とを等量混合し、その100 μlをウェルに入れ、37℃にて1時間反応させた。

【0105】反応終了後、0.05% Tween 20-PBSにて1回洗浄の後、PBSを用いて5000倍希釈したペルオキシダゼ結合抗マウスIgGヤギ抗体(Cappel社製)を100 μlずつ各ウェルに添加し、37℃にて1時間反応させた。

【0106】さらに反応終了後、0.05% Tween 20-PBSにて2回洗浄し、0.4 mg/mlのOPD及び0.04%の過酸化水素を含む0.05 Mリン酸クエン酸緩衝液(pH4.5)を100 μlずつ各ウェルにいれ、室温にて20分間放置し発色させた。反応後、2 N硫酸100 μlを各ウェルに加え、反応を停止させた後、490 nmの吸光度を測定した。

【0107】実施例6 ハイブリド-マの作製

実施例5で抗血清の力価を測定したマウスについて、モノクローナル抗体の作製を行った。

【0108】先ず、実施例4に続き、血清中の抗フサラ

イド抗体の活性が高くなったマウスの脾臓細胞と、マウスミエロ-マ細胞(P3U1)とを電気融合法にて細胞融合をおこなった。細胞増殖が認められた培養上清液について以下の方法でフサライドに対する抗体活性を調べた。

【0109】フサライドハプテン/BSAの溶液(5µg/ml)を50µl/ウェルにて96ウェルプレートにコーティングした。洗浄の後、4倍に希釈したブロックエースでブロッキングした後、培養上清液と各種濃度のフサライドあるいはその類似化合物を含む10%メタノール溶液とを等量混合し、その100µlをウェルに入れ、37℃にて1時間反応させた。反応終了後、0.05% Tween 20-PBSにて1回洗浄の後、PBSを用いて、5000倍希釈したペルオキシダゼ結合抗マウスIgGヤギ抗体(Cappel社製)を50µlずつ各ウェルに入れて37℃で1時間反応させた。

【0110】さらに反応終了後、0.05% Tween 20-PBSにて2回洗浄の後、0.4mg/mlのOPD及び0.04%の過酸化水素を含む0.05Mリン酸クエン酸緩衝液(pH4.5)を100µlずつ各ウェルに入れ、室温にて20分間放置し発色させた。反応後、2N硫酸100µlを各ウェルに加え、発色反応を停止させた後、490nmの吸光度を測定し、特異性のある抗体活性が認められたものを選抜した。

【0111】次に、選抜されたウェルの細胞について限界希釈法を用いた細胞クロ-ニングをおこなった。その結果、抗フサライド抗体を産生するハイブリド-マを数株クロ-ン化した。そのうちのFLD1F9を平成12年2月22日に寄託番号FERM P-17740として工業技術院生命工学工業研究所(〒305-0046茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託した。

【0112】実施例7 フサライドハプテンとHRPとの結合体の作製

実施例2と同様に混合無水物法により、フサライドハプテンとHRPの結合体を作製した。

【0113】1mgのフサライドハプテンを無水ジオキサン0.2mlに溶解した後、トリ-N-ブチルアミン0.5µl、クロロ蟻酸イソブチル0.3µlを添加し、10-12℃にて30分間攪拌した。(以下、これを「B液」とする)

一方、0.5%NaHCO₃をNaOHでpH9.4に調整した溶液1mlにHRP5mgを溶解し、B液をこの中に滴下した。4℃にて2時間攪拌し、さらにグリシンを添加して30分間攪拌することにより反応を終了させた。反応物をPBSにて透析することにより、HRP結合フサライドハプテンを得た。

*【0114】実施例8 直接競合ELISA法によるフサライドの測定

実施例6で得られたハイブリド-マ(FLD1F9)をマウスの腹腔に移植し、10日後ないし15日後に得られた腹水を採取し、硫酸分画法によりモノクローナル抗体を分取した。(以後、各モノクローナル抗体はこれらを産生するモノクローナル抗体産生細胞と同一の名称を用いる。)得られた精製モノクローナル抗体FLD1Fを用いて以下の方法にてフサライドを測定した。

【0115】上記FLD1F9モノクローナル抗体溶液(2µg/ml)を100µl/ウェルで96ウェルプレートに加え、4℃で一晩静置し、翌日4倍希釈したブロックエースでブロッキングを行い、アッセイ用のプレートを作成した。次いで、フサライド及び実施例7で作製した適度に希釈されたHRP結合フサライドハプテンを含む10%メタノール-PBS溶液を50µl/ウェルで加え、37℃で1時間静置した。

【0116】反応終了後、0.05% Tween 20-PBSにて2回洗浄の後、0.4mg/mlのOPD及び0.04%過酸化水素を含む0.05Mリン酸クエン酸緩衝液(pH4.5)を100µlずつ各ウェルに入れ室温にて20分間放置し、発色させた。

【0117】反応後、2N硫酸100µlを各ウェルに加え、反応を停止させた後、490nmの吸光度を測定した。結果を図1に示す。直接競合ELISA法において、フサライドを0.5ng/mlないし1000ng/mlの範囲で測定できた。

【0118】実施例9 モノクローナル抗体の交差反応性

フサライドハプテンに由来する、クロ-ン化したハイブリド-マFLD1F9の産生するモノクローナル抗体FLD1F9について実施例8と同様の方法を用いてフサライドおよび他のチアゾール環を有する類似化合物に対する交差反応性を調べた。結果を図2に示す。モノクローナル抗体FLD1F9は類似化合物のクロロタロニルに約27%の交差反応性を有し、他のキントゼン、CNPに反応性を示さず、フサライド並びにクロロタロニルに対して高い特異性を有する。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明のモノクローナル抗体FLD1F9の直接競合ELISA法によるフサライドの測定を示す。

【図2】図2はモノクローナル抗体FLD1F9を用いた直接競合ELISA法によるフサライドおよび他の類似化合物の測定を示す。

【図1】

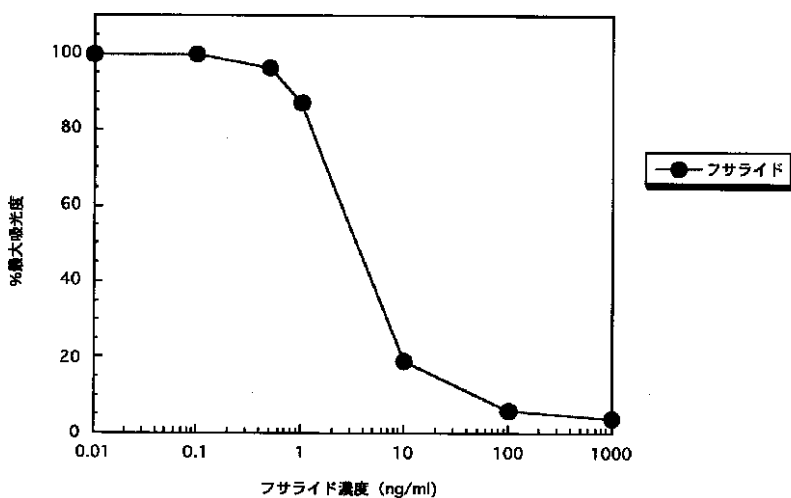


図1. モノクローナル抗体FLD1F9を用いた直接結合ELISA法によるフサライドの測定

【図2】

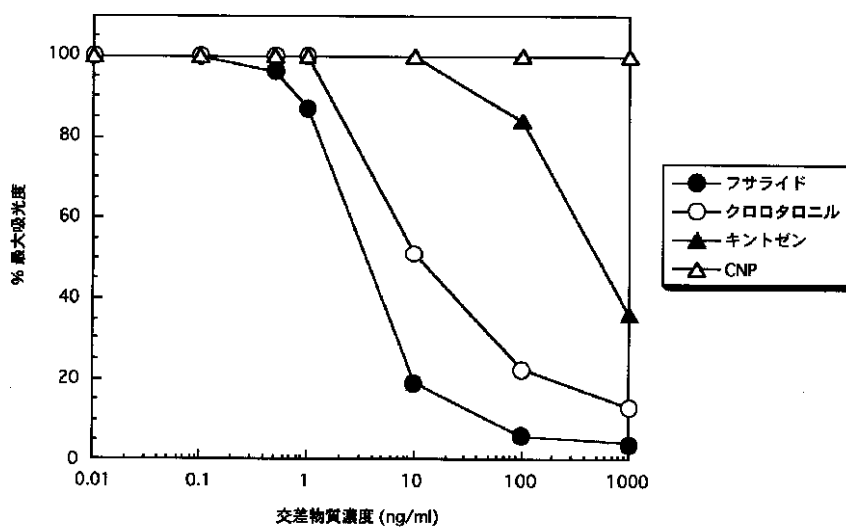


図2. モノクローナル抗体FLD1F9の交差反応性

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)
C 1 2 P 21/08		G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/531		C 1 2 N 5/00	B
33/577		15/00	C

(72)発明者 渡辺 和明
 東京都港区浜松町1丁目27番14号 株式会社
 社環境免疫技術研究所内

(72)発明者 香川 康浩
 東京都港区浜松町1丁目27番14号 株式会社
 社環境免疫技術研究所内

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA53 GA01 HA15
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA13
4B065 AA91X AB05 AC14 BA08
CA25 CA46
4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA50
FA72 FA74

专利名称(译)	fusaride抗体和测量方法		
公开(公告)号	JP2001255324A	公开(公告)日	2001-09-21
申请号	JP2000066367	申请日	2000-03-10
申请(专利权)人(译)	株式会社环境免疫技术研究所		
[标]发明人	伊東茂壽 金井正三 渡辺和明 香川康浩		
发明人	伊東 茂壽 金井 正三 渡辺 和明 香川 康浩		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/44 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/531 G01N33/577		
FI分类号	G01N33/53.G G01N33/53.J C07K16/44 C12P21/08 G01N33/531.A G01N33/577.B C12N5/00.B C12N15/00.C C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/GA01 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(带更正) 要解决的问题: 提供一种免疫化学测量夫沙利德的方法, 所述夫沙利德是爆炸性疾病的控制剂。下式(1): [在式(1)中, n是1-10的整数。通过使用具有以下结构式(2)的抗原, 通过结合具有由高分子化合物表示的结构的化合物来产生抗原: 与具有式(2)表示的结构的化合物具有反应性的抗体或其片段的制备方法, 其包括, 制备具有由式(2)表示的结构的化合物。一种使用上述抗体或片段免疫化学测定邻苯二甲酸酯的方法。

【解決手段】 以下の式(1):

