

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4926497号  
(P4926497)

(45) 発行日 平成24年5月9日(2012.5.9)

(24) 登録日 平成24年2月17日(2012.2.17)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08
C 0 7 K	16/44 (2006.01)	C 0 7 K	16/44
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 1
G 0 1 N	33/577 (2006.01)	G 0 1 N	33/577 B
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 S

請求項の数 12 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-50224 (P2006-50224)  
 (22) 出願日 平成18年2月27日(2006.2.27)  
 (65) 公開番号 特開2007-186488 (P2007-186488A)  
 (43) 公開日 平成19年7月26日(2007.7.26)  
 審査請求日 平成20年11月20日(2008.11.20)  
 (31) 優先権主張番号 特願2005-357433 (P2005-357433)  
 (32) 優先日 平成17年12月12日(2005.12.12)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

特許法第30条第1項適用 2005年6月15日大阪国際交流センターにおいて開催された日本環境化学会主催の「第14回討論会」において文書をもって発表

微生物の受託番号 IPOD FERM P-20744  
 微生物の受託番号 IPOD FERM P-20547

(73) 特許権者 000173809  
 財団法人電力中央研究所  
 東京都千代田区大手町1丁目6番1号  
 (74) 代理人 100107515  
 弁理士 廣田 浩一  
 (74) 代理人 100107733  
 弁理士 流 良広  
 (74) 代理人 100115347  
 弁理士 松田 奈緒子  
 (72) 発明者 佐々木 和裕  
 千葉県我孫子市我孫子1646 財団法人  
 電力中央研究所 環境科学研究所内  
 (72) 発明者 大村 直也  
 千葉県我孫子市我孫子1646 財団法人  
 電力中央研究所 環境科学研究所内  
 最終頁に続く

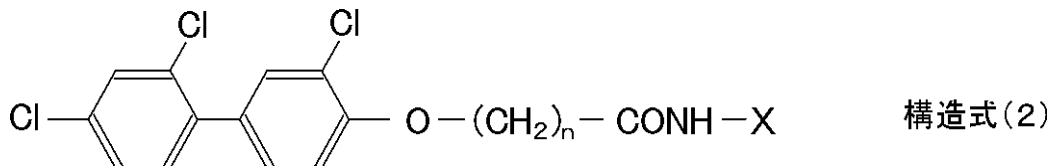
(54) 【発明の名称】 抗PCBモノクローナル抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記構造式(2)で表される構造を有し、3塩素化物PCBに反応性を有する抗PCBモノクローナル抗体の調製に用いられることを特徴とする化合物。

【化1】

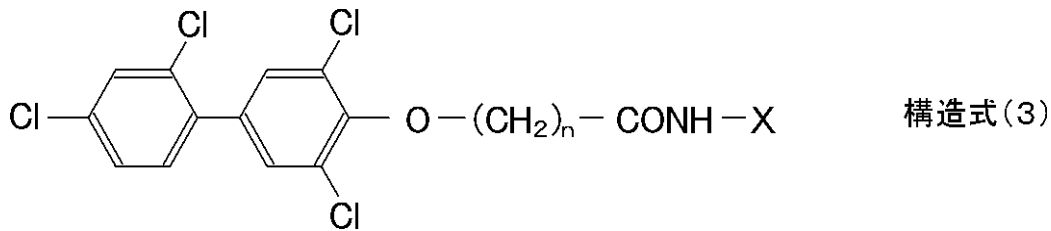


ただし、前記構造式(2)中、nは1~20の整数を表し、Xはタンパク質を表す。

【請求項2】

下記構造式(3)で表される構造を有し、3塩素化物PCBに反応性を有する抗PCBモノクローナル抗体の調製に用いられることを特徴とする化合物。

【化2】



ただし、前記構造式(3)中、 $n$ は1~20の整数を表し、 $X$ はタンパク質を表す。

【請求項3】

請求項1から2のいずれかに記載の化合物を用いることを特徴とする抗PCBモノクローナル抗体の製造方法。

10

【請求項4】

請求項1から2のいずれかに記載の化合物を免疫源としてマウスを免疫し、免疫した前記マウスの脾臓細胞を回収し、該脾臓細胞とミエローム細胞とを融合して得たハイブリドーマを培養することを含む請求項3に記載の抗PCBモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項5】

請求項3から4のいずれかに記載の抗PCBモノクローナル抗体の製造方法により製造され、3塩素化合物PCBに反応性を有することを特徴とする抗PCBモノクローナル抗体。

【請求項6】

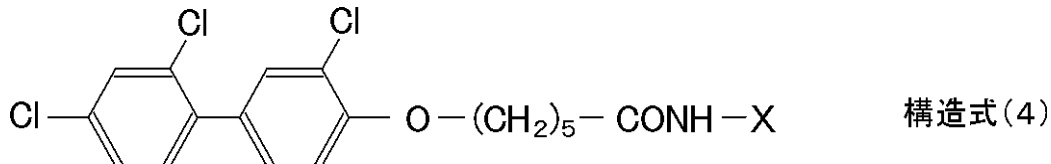
請求項5に記載の抗PCBモノクローナル抗体を産生することを特徴とするハイブリドーマ。

20

【請求項7】

下記構造式(4)で表される構造を有する化合物を用いて作製された請求項6に記載のハイブリドーマ。

【化3】



30

ただし、前記構造式(4)中、 $X$ はタンパク質を表す。

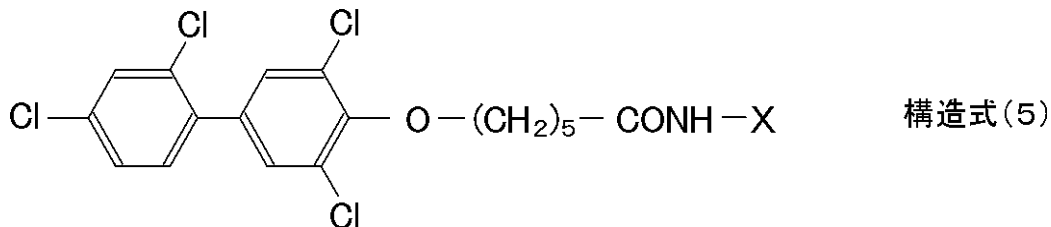
【請求項8】

受託番号がFERM P-20744である請求項7に記載のハイブリドーマ。

【請求項9】

下記構造式(5)で表される構造を有する化合物を用いて作製された請求項6に記載のハイブリドーマ。

【化4】



40

ただし、前記構造式(5)中、 $X$ はタンパク質を表す。

【請求項10】

受託番号がFERM P-20547である請求項9に記載のハイブリドーマ。

【請求項11】

請求項5に記載の抗PCBモノクローナル抗体を用いることを特徴とするPCB測定方法。

50

## 【請求項 1 2】

請求項 5 に記載の抗 P C B モノクローナル抗体を含むことを特徴とする P C B 測定用キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、抗 P C B モノクローナル抗体及びその製造方法、前記抗 P C B モノクローナル抗体の作製に用いられる化合物及びハイブリドーマ、並びに前記抗 P C B モノクローナル抗体を用いた P C B 測定方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

P C B (ポリ塩化ビフェニル)は、安定性や絶縁性の高さから、変圧器及びコンデンサー等の電気絶縁材、並びに熱媒体などとして広く使用されてきたが、人体や環境への有害性が確認されたことから製造や使用が禁止された。P C B は、難分解性で環境中に残留し、食物連鎖を通じて生物に蓄積され、人の健康や生態系に影響を及ぼす性質を有する残留性有機汚染物質の代表的な化学物質として規制されており、P C B を含む廃棄物は、適正に処理されるまで、生活環境の保全上支障のないように保管することが義務づけられている。

しかし、適正処理が行われずに保管されていた P C B 廃棄物は、保管の長期化により、紛失や漏洩の発生が問題視され、平成 13 年に「ポリ塩化ビフェニル廃棄物の適正な処理の推進に関する特別措置法」(P C B 特措法)が施行された。この P C B 特措法により、15 年以内に全ての P C B 廃棄物の適正処理が義務付けられた。

## 【0003】

例えば、絶縁油の場合、保管されている絶縁油以外にも、過去において P C B を絶縁油として使用していた変圧器において置換された代替絶縁油も、前記変圧器内に微量に残留した P C B に汚染されていることが知られており、このような変圧器中代替絶縁油も含め、大量の P C B 濃度を検査し、迅速に処理の必要性の有無を明確にする必要がある。また、処理を行った P C B 廃棄物に対し、処理後の P C B 残留濃度、環境中の P C B 濃度を検査することも極めて重要である。

## 【0004】

従来の P C B 分析方法としては、例えば、公定法として、高分解能ガスクロマトグラフ-高分解能質量分析(H R G C - H R M S)や、電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフ法(G C E C D 法)が用いられている(非特許文献 1 参照)。これらの方法は分解能が高く、また定量下限も低いのが、分析に要する時間が長く、分析の妨害となる夾雑成分を除去する試料の操作が煩雑であり、コスト負担が大きいという問題がある。このため、簡便かつ迅速な分析方法で、測定現場で簡易に測定可能な方法が求められていた。

## 【0005】

これに対し、簡便かつ迅速な分析方法として、抗原抗体反応を利用した免疫学的測定法(イムノアッセイ)が提案されている。前記免疫学的測定法としては、ラジオイムノアッセイ(R I A)、蛍光イムノアッセイ(F I A)、エンザイムイムノアッセイ(E I A、E L I S A)等があるが、これらいずれの測定方法においても、検出対象である P C B に対して特異的に反応する抗 P C B 抗体が重要な要素となる。

## 【0006】

抗 P C B 抗体としては、P C B が水難溶性であるため、P C B が抽出された有機極性溶媒や、P C B を水溶液に溶存させるために用いる極性溶媒を含む試料溶液に耐性を有し、抗原認識可能であることが求められており、例えば、50(v/v)%有機溶媒水溶液中でも抗原認識特性が実質的に低下しない抗モノクローナル抗体(特許文献 1 参照)等が提案されている。また、多数の異性体が存在する P C B においては、交差反応性が制御された特異性の高い抗 P C B 抗体が求められており、例えば、コプラナー P C B の一つである 3,3',5,5'-四塩化ビフェニル(P C B 80)に対して特異性を持つ抗体(特許文献 2 参

10

20

30

40

50

照)等が提案されている。

【0007】

一方、PCB異性体の中でも、使用禁止までの期間においてコンデンサー、熱媒体、潤滑油、及び蛍光灯安定器等に最も多く含まれ、汎用性が高かった三塩化ビフェニルを多く含むPCBを効率的に検出し、高感度に定量できる抗PCB抗体が求められている。

しかしながら、三塩化ビフェニル等の塩素数が少ない低塩素化物PCBに対する特異性が高く、かつ極性溶媒存在下においてPCBとの結合性が低下することなく、三塩化ビフェニルを多く含むPCB(例えば、鐘淵化学工業製のカネクロール300(KC300)、及び三菱モンサント(現三菱化学)製のアロクロール1242(Ar.1242)などに由来するPCB)を高感度で定量性に優れた抗PCBモノクローナル抗体は、未だ満足なものが提供されておらず、改良が求められているのが現状である。

10

【0008】

【特許文献1】特開2000-191699号公報

【特許文献2】特開2005-247822号公報

【非特許文献1】「絶縁油中のポリ塩素化ビフェニル(PCB)の分析方法規定」(電気技術基準調査委員会編集、社団法人日本電気協会発行、平成3年9月30日発行)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は従来における前記問題を解決し、以下の目的を達成することを課題とする。即ち、本発明は、三塩化ビフェニル等の塩素数が少ない低塩素化物PCBに対する特異性が高く、かつ極性溶媒存在下においてPCBとの結合性が低下することなく、三塩化ビフェニルを多く含むPCB(例えば、鐘淵化学工業製のカネクロール300(KC300)、及び三菱モンサント(現三菱化学)製のアロクロール1242(Ar.1242)などに由来するPCB)を高感度で定量性に優れた抗PCBモノクローナル抗体、該抗PCBモノクローナル抗体の作製方法、及び該抗PCBモノクローナル抗体を用いたPCB測定方法を提供することを目的とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0010】

前記課題を解決するため、本発明者らが鋭意検討を重ねた結果、四塩化ビフェニル及び三塩化ビフェニルをハプテンとし、該ハプテンを、特定のリンカーを介してキャリアタンパク質に結合した化合物を用いることにより、従来既存の抗PCB抗体よりも3塩素化物に対する親和性が極めて高く、低塩素化物の検出下限値が極めて低い抗PCBモノクローナル抗体が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

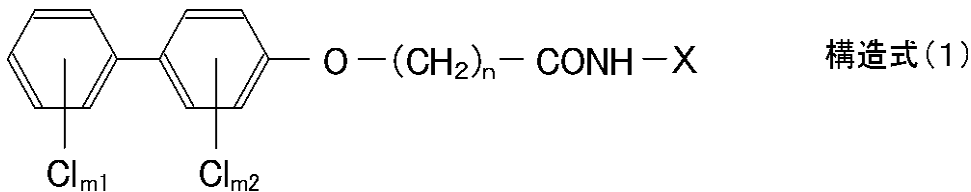
30

【0011】

本発明は、本発明者による前記知見に基づくものであり、前記課題を解決するための手段としては、以下の通りである。即ち、

<1> 下記構造式(1)で表される構造を有し、抗PCBモノクローナル抗体の調製に用いられることを特徴とする化合物である。

【化6】

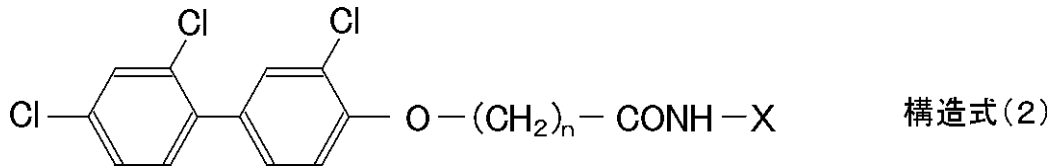


40

ただし、前記構造式(1)中、nは1~20の整数を表し、m1及びm2はそれぞれ0~2の整数を表し、m1とm2との和は1~4であり、Xはタンパク質を表す。

<2> 下記構造式(2)で表される構造を有する前記<1>に記載の化合物である。

## 【化7】



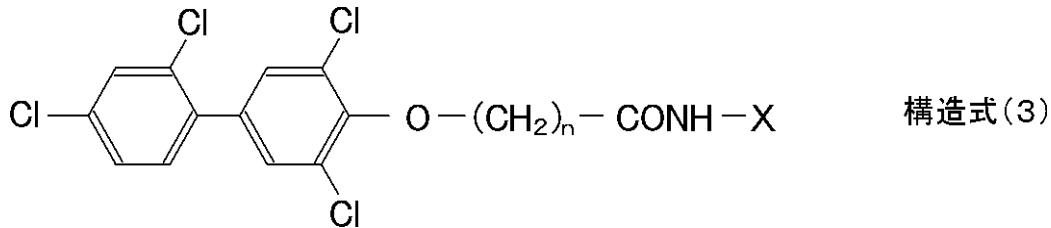
ただし、前記構造式(2)中、 $n$ は1~20の整数を表し、 $X$ はタンパク質を表す。

<3> 前記構造式(2)中、 $n$ が5であり、 $X$ がヘモシアニンである前記<2>に記載の化合物である。

## 【0012】

<4> 下記構造式(3)で表される構造を有する前記<1>に記載の化合物である。

## 【化8】



ただし、前記構造式(3)中、 $n$ は1~20の整数を表し、 $X$ はタンパク質を表す。

<5> 前記構造式(3)中、 $n$ が5であり、 $X$ がヘモシアニンである前記<2>に記載の化合物である。

## 【0013】

<6> 前記<1>から<5>のいずれかに記載の化合物を用いることを特徴とする抗PCBモノクローナル抗体の製造方法である。

<7> 前記<1>から<5>のいずれかに記載の化合物を免疫源としてマウスを免疫し、免疫した前記マウスの脾臓細胞を回収し、該脾臓細胞とミエロマ細胞とを融合して得たハイブリドーマを培養することを含む前記<6>に記載の抗PCBモノクローナル抗体の製造方法である。

## 【0014】

<8> 前記<6>から<7>のいずれかに記載の抗PCBモノクローナル抗体の製造方法により製造されたことを特徴とする抗PCBモノクローナル抗体である。

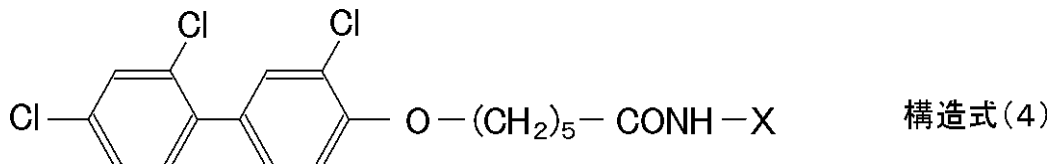
<9> 三塩化ビフェニルに対する親和性が、他の塩素数のPCBに対する親和性よりも高い前記<8>に記載の抗PCBモノクローナル抗体である。

## 【0015】

<10> 前記<8>から<9>のいずれかに記載の抗PCBモノクローナル抗体を産生することを特徴とするハイブリドーマである。

<11> 下記構造式(4)で表される構造を有する化合物を用いて作製された前記<10>に記載のハイブリドーマである。

## 【化9】



ただし、前記構造式(4)中、 $X$ はタンパク質を表す。

<12> 受託番号がFERM P-20744である前記<11>に記載のハイブリドーマである。

<13> 下記構造式(5)で表される構造を有する化合物を用いて作製された前記<10>に記載のハイブリドーマである。

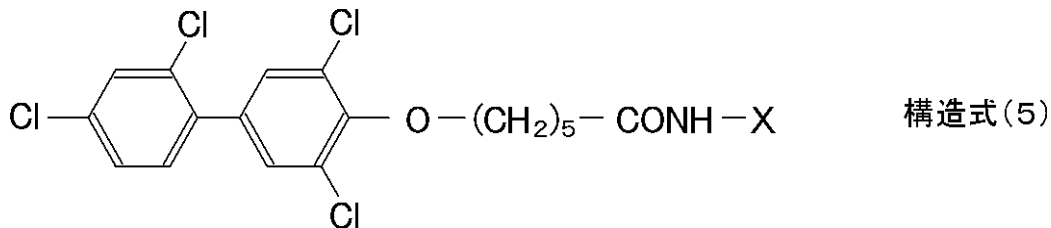
10

20

30

40

## 【化10】



ただし、前記構造式(5)中、Xはタンパク質を表す。

<14> 受託番号がFERM P-20547である前記<13>に記載のハイブリドーマである。

10

## 【0016】

<15> 前記<8>から<9>のいずれかに記載の抗PCBモノクローナル抗体を用いることを特徴とするPCB測定方法である。

<16> 前記<8>から<9>のいずれかに記載の抗PCBモノクローナル抗体を含むことを特徴とするPCB測定用キットである。

## 【発明の効果】

## 【0017】

本発明によると、三塩化ビフェニル等の塩素数が少ない低塩素化物PCBに対する特異性が高く、かつ極性溶媒存在下においてPCBとの結合性が低下することなく、三塩化ビフェニルを多く含むPCB(例えば、鐘淵化学工業製のカネクロール300(KC300)、及び三菱モンサント(現三菱化学)製のアロクロール1242(Ar.1242)などに由来するPCB)を高感度で定量性に優れた抗PCBモノクローナル抗体、該抗PCBモノクローナル抗体の作製方法、及び該抗PCBモノクローナル抗体を用いたPCB測定方法を提供することができる。

20

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0018】

(抗PCBモノクローナル抗体)

<抗PCBモノクローナル抗体の製造方法>

本発明の抗PCBモノクローナル抗体は、ハプテンとしてPCBと、リンカーと、免疫原性を有する高分子量物質とからなる複合体を用い、本発明の抗PCBモノクローナル抗体の製造方法により製造される。

30

PCBは、単独では抗原性を持たないため、PCBを認識する抗体を作製するために、前記化合物(以下、「抗体調製用化合物」という)を調製し、これを免疫源(抗原)として用い、前記抗PCBモノクローナル抗体を作製する。

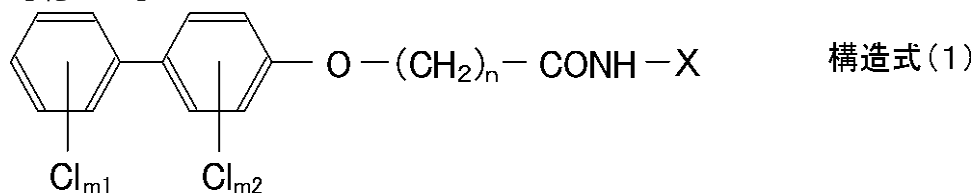
## 【0019】

<<抗体調製用化合物(免疫源)>>

本発明の抗PCBモノクローナル抗体の調製に用いられる前記抗体調製用化合物は、下記構造式(1)で表される構造を有する化合物である。

## 【0020】

## 【化11】



40

ただし、前記構造式(1)中、nは1~20の整数を表し、m1及びm2はそれぞれ0~2の整数を表し、m1とm2との和は1~4であり、Xはタンパク質を表す。

## 【0021】

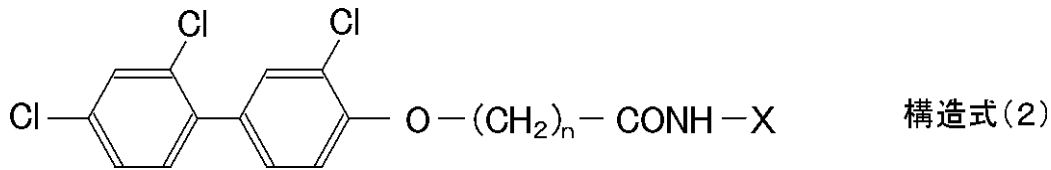
前記ハプテンとしてのPCBは、三塩化ビフェニル、及び四塩化ビフェニルのいずれかであることが好ましく、また、少なくとも1つの塩素がオルト位(2位又は6位)に配さ

50

れたものが好ましく、例えば、下記構造式(2)及び(3)で表される化合物がより好ましく、下記構造式(2)で表される化合物が特に好ましい。

【0022】

【化12】

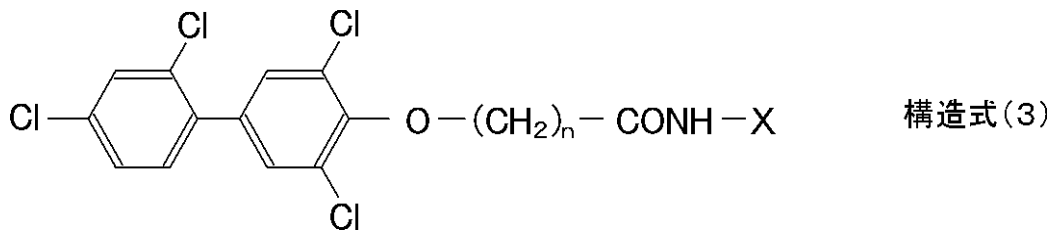


ただし、前記構造式(2)中、nは1~20の整数を表し、Xはタンパク質を表す。

10

【0023】

【化13】



ただし、前記構造式(3)中、nは1~20の整数を表し、Xはタンパク質を表す。

20

【0024】

前記構造式(1)~(3)中、Xで表されるタンパク質(「キャリアタンパク質」ということがある)としては、免疫原性を有し、かつ前記ハプテンとしてのPCBをリンカーを介して連結する際に、該リンカーと結合可能な反応基を有する限り、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、スカシガイ由来ヘモシアニン(KLH)、卵白アルブミン(OVA)、ウシ血清アルブミン(BSA)、ヒト血清アルブミン、ウサギ血清アルブミン、ヤギ血清アルブミン、ウシガンマグロブリン等が挙げられる。これらの中でも、スカシガイ由来ヘモシアニン(KLH)が好ましい。

【0025】

また、前記リンカーとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、前記構造式(1)~(3)中、-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CONH-で表される構造となって前記ハプテンと前記タンパク質とを連結するものが好ましく、nは、4~6が好ましく、5がより好ましい。

30

【0026】

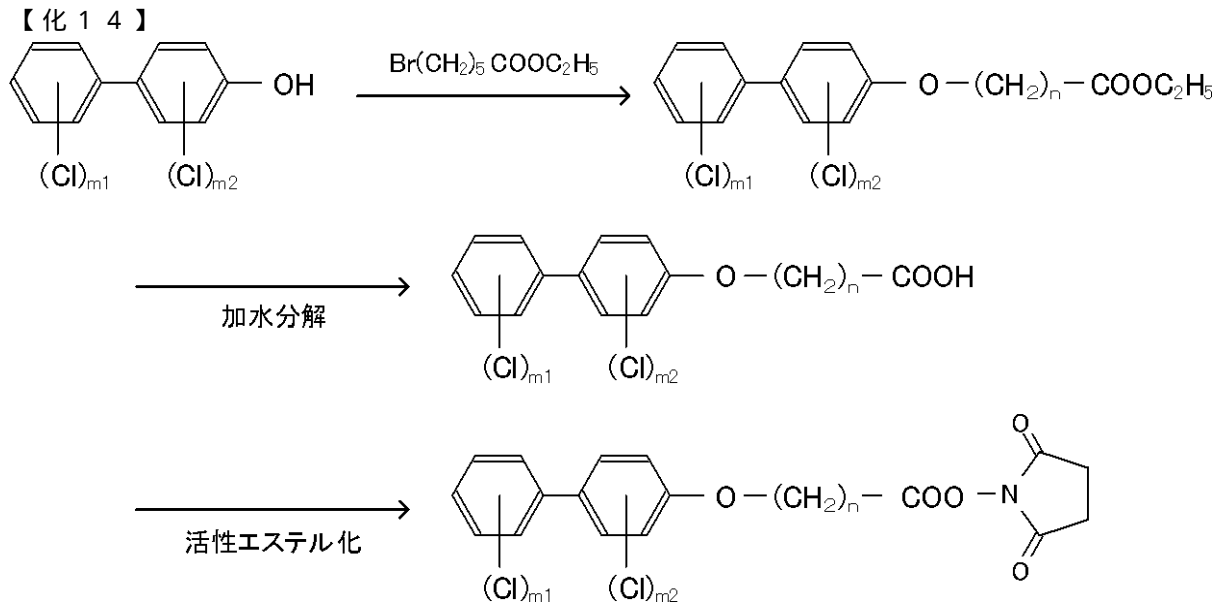
本発明の抗体調製用化合物の模式図の一例を、図1に示す。

【0027】

前記抗体調製用化合物の調製方法としては、特に制限はなく、公知の合成方法により調製することができ、例えば、前記リンカーと前記ハプテンとしてのPCBとからなる化合物を、例えば下記に示す方法により合成し、これを前記タンパク質(キャリアタンパク質)を含む溶液中に添加し、前記リンカーを前記タンパク質に結合させることにより調製する方法が挙げられる。

40

【0028】



10

## 【0029】

得られた前記抗体調製用化合物は、必要に応じて反応液を免疫源として使用するのに好適な生理的リン酸緩衝液などの中性溶液に置換し、ろ過や透析等の公知の方法により精製することが好ましい。

20

## 【0030】

<<ハイブリドーマ>>

前記抗PCBモノクローナル抗体は、例えば、前記抗体調製用化合物を免疫源として動物を免疫し、免疫した前記動物の脾臓細胞を回収し、該脾臓細胞とミエローマ細胞とを融合して得たハイブリドーマを培養することにより製造される。

## 【0031】

免疫する前記動物としては、マウス、ラット、ウサギ、イヌ等の哺乳動物が好ましく、マウスがより好ましい。

前記動物の免疫方法としては、特に制限はなく、公知の方法から適宜選択することができる、例えば、前記抗体調製用化合物を、アジュバントとともに、皮下、静脈内、腹腔内に注射等により投与する方法が挙げられる。前記抗体調製用化合物は、例えば、最初に投与した後（初回免疫後）2週間程度の間隔で2～3回投与されることが好ましい。

30

前記アジュバントとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、例えば、Corixa Corporation製のRIBI Adjuvant (MPL+TDM Emulsion)等が好ましい。

## 【0032】

前記抗体調製用化合物の最後の投与から数日後から数ヶ月後に、脾臓を摘出し、抗体産生可能な細胞が単離される。前記抗体産生可能な細胞は、ミエローマ細胞と融合され、その後所望の抗体を産生する融合細胞をスクリーニングすることにより、前記ハイブリドーマが得られる。

40

前記ミエローマ細胞としては、例えば、Bulb/cマウス由来の骨髓腫細胞株、Sp2/0-Ag14等が挙げられる。

前記抗体産生可能な細胞とミエローマ細胞との融合方法としては、特に制限はなく、公知の方法から適宜選択することができるが、例えば、ポリエチレングリコール法が好ましい。

## 【0033】

前記所望の抗体を産生する融合細胞をスクリーニングする方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる、例えば、標識を用いた方法が挙げられ、具体的には、担体に固定化した抗原（抗体調製用化合物）に前記ハイブリドーマ培養上清を添加し、前記抗原に結合した前記抗体を、標識した二次抗体を用いて蛍光センサーで検出す

50

る一次スクリーニング、及び、前記ハイブリドーマ培養上清に過剰量の抗原（PCB）を添加して平衡化した後、前記抗原と結合しなかった前記抗体について、前記担体に固定化した前記抗原（抗体調製用化合物）との結合を測定する二次スクリーニングからなり、前記一次スクリーニングと前記二次スクリーニングとの差から、所望の抗原と結合する抗体を特定する方法等が挙げられる。

#### 【0034】

以下、Bulb/cマウスを用いた本発明の抗PCBモノクローナル抗体の作製方法の例を説明する。

#### 【0035】

- マウスの免疫 -

前記抗体調製用化合物（タンパク質量にして約0.3mg）をCorixa Corporation製のRIBI Adjuvant（MPL+TDM Emulsion）に混合し、Bulb/cマウス（メス、5週齢）に対し皮下注射により免疫する。初回免疫の2週間後と4週間後に、初回と同量の前記抗体調製用化合物をCorixa Corporation製のRIBI Adjuvant（MPL+TDM Emulsion）に混合後、皮下注射する。更に1週間以上経過した後、同量の前記抗体調製用化合物を、腹腔又は尾部静脈に注射し、その4～5日後に脾臓を摘出する。

#### 【0036】

- ハイブリドーマの作製 -

前記脾臓由来の細胞を、RPMI 1640培地で洗浄した後、ポリエチレングリコール溶液中でミエローマ細胞と2分間混合することにより、融合反応を行う。

前記ミエローマ細胞としては、例えば、凍結保存されていたものを細胞融合実験の約10日前に解凍し、10%牛胎児血清を含むRPMI 1640培地で培養したものが好ましい。また、状態の良いミエローマ細胞を調製するために、細胞融合を行う前日には必ず培地交換を行うことが好ましい。

#### 【0037】

融合反応後、得られた融合細胞は、例えば、20%牛胎児血清を含むHAT培地（Hypoxanthin Aminopterin Thymidine培地）に懸濁後、96穴マイクロプレート等に分注する。融合反応の翌日及び5日後に、培養液を新しいHAT培地（含20%牛胎児血清）に交換し、以後、ほぼ4日に1度の頻度で培養液を新しいHT培地（含10%牛胎児血清）に交換することが好ましい。

#### 【0038】

- ハイブリドーマのスクリーニング -

ハイブリドーマのスクリーニングは、細胞融合して得た融合細胞の培養上清を分析することにより行うことができる。具体的には、細胞融合から2週間以上経過したハイブリドーマの培養上清を分析し、所望の抗体を分泌するハイブリドーマを選択することが好ましい。以下に分析方法の一例として、蛍光標識した二次抗体を用い、蛍光光度計により分析する方法を説明するが、該分析方法に限定されるものではない。

二次抗体の標識としては、例えば、ペルオキシダーゼ、ビオチン、金コロイドなどが好適に挙げられる。

#### 【0039】

- - 抗体分析 - -

(1) 抗原ビーズの作製

図1に示す前記抗体調製用化合物におけるリンカーと同じリンカーと、ハプテン（例えば、二塩化フェノール）とを有する化合物を合成し、キャリアータンパク質（例えば、卵白アルブミン）と結合させて複合体としたハイブリドーマスクリーニング用抗原を調製し、これをビーズ（例えば、アガロースビーズ等）に固定化する。

前記ビーズに対し、前記ハイブリドーマスクリーニング用抗原を固定化した後、牛血清アルブミン（BSA）溶液を用いて、前記ハイブリドーマスクリーニング用抗原が結合されていない前記ビーズの表面をブロックする。

10

20

30

40

50

## 【0040】

## (2) 蛍光光度計による測定

蛍光光度計による測定としては、例えば、前記(1)で調製した前記抗原ビーズに、前記ハイブリドーマの培養上清を作用させた後、前記抗原ビーズをPBS(Phosphate buffer saline)緩衝液によって洗浄し、蛍光物質にて標識した二次抗体を作用させ、次いで、PBS緩衝液により洗浄したビーズの蛍光強度を測定することにより行うことができる。

前記二次抗体には前記蛍光物質が結合されているため、洗浄後、前記抗原ビーズ上に残った蛍光の強度から、前記ハイブリドーマ培養上清中の所望の抗体の有無を判断することができる。前記蛍光強度は、蛍光光度計等を適宜用いて測定することができる。

10

## 【0041】

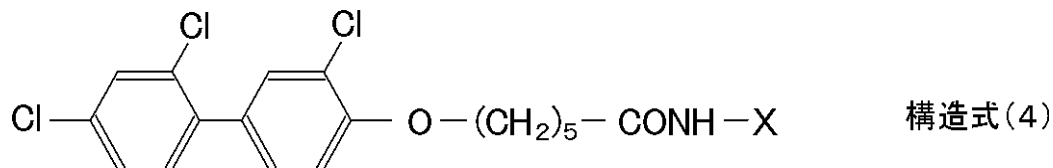
前記ハイブリドーマとしては、PCBを認識する本発明の抗PCBモノクローナル抗体を産生する限り、特に限定されないが、上記の方法により作製され、樹立されたものが好ましく、具体的にはSk3A11株、及びSk2E4株がより好ましく、Sk3A11株が特に好ましい。

## 【0042】

前記Sk3A11株は、下記構造式(4)、具体的には図1に示す抗体調製用化合物を用いて作製されたハイブリドーマであり、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平成17年12月22日付で、受託番号FERM P-20744として寄託されている。

20

## 【化15】



ただし、前記構造式(4)中、Xはタンパク質を表す。

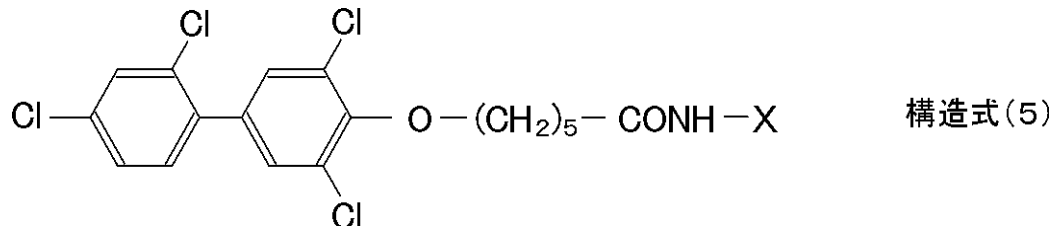
## 【0043】

前記Sk2E4株は、下記構造式(5)に示す抗体調製用化合物を用いて作製されたハイブリドーマであり、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平成17年5月26日付で、受託番号FERM P-20547として寄託されている。

30

## 【0044】

## 【化16】



ただし、前記構造式(5)中、Xはタンパク質を表す。

40

## 【0045】

## &lt;&lt;抗PCBモノクローナル抗体の産生及び精製&gt;&gt;

前記ハイブリドーマを、培地(例えば、10%ウシ胎児血清を含むDMEM等)を用いて培養し、得られた培養液の上清を、抗PCBモノクローナル抗体溶液とすることができる。

また、前記ハイブリドーマを培養して得た培地から、前記抗PCBモノクローナル抗体を精製する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて公知の方法から適宜選択することができ、例えば、限外ろ過、硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過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等の濃縮方法や精製方法により精製することができる。

50

## 【 0 0 4 6 】

< 抗 P C B モノクローナル抗体の評価 >

前記抗 P C B モノクローナル抗体は、P C B との親和性、特に塩素数の異なる P C B の間で異なる親和性を比較することにより、P C B に対する親和性、及び反応の特異性（交差反応性）を評価することができる。

前記親和性は、前記抗 P C B モノクローナル抗体の P C B との結合を 5 0 % 阻害する抗原濃度（I C <sub>50</sub> 値）により評価することができる。

前記特異性（交差反応性）は、例えば、3 塩素化物 P C B に対する I C <sub>50</sub> 値と、4 ~ 6 塩素化物 P C B に対する I C <sub>50</sub> 値とを比較することにより、具体的にはそれぞれの I C <sub>50</sub> 値の比を求めることにより評価することができる。

10

## 【 0 0 4 7 】

前記 I C <sub>50</sub> 値の算出方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、例えば、蛍光光度計による測定データを、下記式（1）で表される近似式に当てはめて求めることにより解析することができる。

## 【 0 0 4 8 】

【数 1】

$$y=99/(1+(x/P1)^{P2})+0.5 \quad \text{式(1)}$$

前記式（1）中、y は、抗原を加えなかったときの蛍光強度の値を 1 0 0 % とした時の相対的な蛍光強度を表し、x は、抗原濃度を表し、P 1 と P 2 は、近似のパラメータを表す。

20

## 【 0 0 4 9 】

測定データは、抗原を加えなかったときの蛍光強度の値を 1 0 0 % として相対値に変換した後、グラフ作成ソフトウェア Origin version 6.0 (OriginLab 製) を用いて最適な P 1 及び P 2 を決定する。

このようにして得られた近似式を、前記抗体と前記抗原との結合曲線とし、y = 5 0 % となるとき x の値 (= P 1) を I C <sub>50</sub> 値とする。

なお、I C <sub>50</sub> 値に対して抗体濃度が十分に小さい時（例えば、1 0 分の 1 以下の時）、I C <sub>50</sub> 値と平衡解離定数（K d）がほぼ一致することが知られている。

## 【 0 0 5 0 】

前記抗 P C B モノクローナル抗体の塩素数の異なる P C B に対する特異性は、例えば、カネクロール（K C - 3 0 0、K C - 4 0 0、K C - 5 0 0、K C - 6 0 0、K C - 1 0 0 0）を標準試料として評価することができる。

30

前記カネクロールは、それぞれ下記表 1 に示す比率で異なる塩素数の P C B を含有しているため、例えば、本発明の抗 P C B モノクローナル抗体は、三塩化ビフェニルに高い特異性を示すため、カネクロール（K C - 3 0 0、K C - 4 0 0、K C - 5 0 0、K C - 6 0 0、K C - 1 0 0 0）の中でも K C - 3 0 0 に対して最も高い特異性を示す。

## 【 0 0 5 1 】

【表 1】

PCB異性体	KC-300	KC-400	KC-500	KC-600
1塩素化物	0.0025	0.01	0.008	0.008
2塩素化物	12.1	0.48	0.38	0.23
3塩素化物	54.98	17.47	1.72	0.65
4塩素化物	27.05	51.43	10.31	1.09
5塩素化物	4.72	27.92	51.80	8.58
6塩素化物	1.08	2.55	32.49	42.34
7塩素化物	0.04	0.14	3.23	39.19
8塩素化物	0.00	0.00	0.06	7.44
9塩素化物	0.00	0.00	0.00	0.47
10塩素化物	0.00	0.00	0.00	0.01

(出典：高菅卓三ら、「各種クリーンアップ法とHRGC/HRMSを用いたポリ塩化ビフェニル(PCBs)の全異性体詳細分析方法」, 環境化学, Vol. 5, No. 3, p. 647 - 675, 1995)

## 【0052】

(PCB測定方法)

本発明のPCB測定方法は、本発明の抗PCBモノクローナル抗体を用いる方法であれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記抗PCBモノクローナル抗体を用い、試料中のPCBを免疫学的に検出、定量する方法、具体的には、免疫クロマトグラフィー、ラジオイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、免疫発光測定法、エンザイムイムノアッセイ(EIA、ELISA)、化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)、免疫比濁法(TIA)、ラテックス免疫比濁法(LTIA)、蛍光センサー法等が挙げられる。

## 【0053】

測定対象のPCBは低分子化合物であるため、競合法により測定することが好ましく、前記競合法としては、担体(例えば、マイクロプレートのウェル、ビーズ、チューブ等)に抗原を固定化する間接競合法(間接競合ELISA法)、前記担体に抗体を固定化する直接競合法(直接競合ELISA法)が挙げられる。同様に、結合平衡除外法も好ましく、前記結合平衡除外法としては、前記担体に前記抗原を固定化する方法が挙げられる。

## 【0054】

前記間接競合法及び前記結合平衡除外法において、前記担体に固定化する抗原(以下、「固定化抗原」という)は、前記抗体調製用抗原のハプテンとは異なるハプテンを有するものが好ましく、該固定化抗原のハプテンとしては、例えば、二塩化フェノールが挙げられる。

前記間接競合法及び前記結合平衡除外法は、前記固定化抗原を前記担体上に固定化し、前記担体の前記固定化抗原が結合していない部分をブロッキング剤でブロッキングする。次いで、該担体に試料と前記抗PCBモノクローナル抗体とを加え、前記固定化抗原と前記試料中のPCBとを前記抗PCBモノクローナル抗体に対して前記間接競合法においては競合反応させ、前記結合平衡除外法においては結合平衡除外化反応させる。

前記固定化担体と結合しなかった前記抗PCBモノクローナル抗体を洗浄除去した後、二次抗体として標識した抗体を加え、前記固定化抗原と結合した抗PCBモノクローナル抗体と結合させ、洗浄を行った後、前記標識の発色又は発光を測定する。得られた吸光度や光強度について、試料を添加しない場合の値に対する減少率を求め、これを阻害率とし

10

20

30

40

50

、既知の濃度のPCBを添加したときの阻害率からあらかじめ求めておいた検量線を用い、前記試料中のPCB濃度を算出することができる。

【0055】

前記直接競合法においても、前記試料中のPCBと競合させる標識抗原は、前記抗体調製用抗原のハプテンとは異なるハプテンを有する化合物と酵素とを結合してなるものが好ましく、該標識抗原のハプテンとしては、例えば、二塩化フェノールが挙げられる。

前記直接競合法は、前記担体に前記抗PCBモノクローナル抗体を固定化し、結合していない部分をブロッキング剤でブロッキングする。次いで、試料と前記標識抗原とを加え、前記試料中のPCBと前記標識抗原とを競合反応させる。前記抗PCBモノクローナル抗体と結合しなかった前記標識抗原を洗浄除去した後、反応生成物の発色又は発光を測定する。得られた吸光度や光強度について、試料を添加しない場合の値に対する減少率を求め、これを阻害率とし、既知の濃度のPCBを添加したときの阻害率からあらかじめ求めておいた検量線を用い、前記試料中のPCB濃度を算出することができる。

10

【0056】

前記標識としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、酵素としてペルオキシダーゼを用い、基質に過酸化水素、発色剤にo-フェニレンジアミンやテトラメチルベンジジンを使用する場合、及び酵素としてアルカリホスファターゼを用い、基質にp-ニトロフェニルリン酸を使用する場合には、発色を吸光度で測定することができる。一方、基質の反応生成物が蛍光である場合や、蛍光物質を用いて標識されている場合には、蛍光光度計等を用いて蛍光を測定することができる。また、化学発光物質を用いる場合には、発光を化学発光測定器等により測定することができ、金コロイドを用いる場合には、透過光度等を透過光量測定器等により測定することができる。

20

【0057】

前記試料としては、例えば、被験物質中のPCBを極性溶媒で液液抽出してなる試料、及び前記被験物質中のPCBを極性溶媒で液液抽出し、抽出された前記PCBを含む前記極性溶媒を吸着剤で固相抽出し、前記吸着剤に吸着した成分を所望の溶媒に転溶させてなる試料などが挙げられる。

【0058】

前記極性溶媒としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ジメチルホルムアミド、アセトニトリル、スルホラン、1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン等が挙げられ、これらの中でも、ジメチルスルホキシド(DMSO)が好ましい。

30

【0059】

前記液液抽出において、前記被験物質と前記極性溶媒との混合比(質量比)としては、(前記被験物質):(前記極性溶媒)=1:1~1:10が好ましい。

【0060】

前記被験物質としては、少なくともPCBを含む可能性がある物質(PCB汚染物)であれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、絶縁油、絶縁油以外の油(例えば、植物油、動物油、合成油、鉱物油等)、工場排水、土壌、排ガス、動物の血液や体液、絶縁油の処理作業等において使用した部材等の廃棄物などが挙げられる。これらの中でも、絶縁油が好適に挙げられる。

40

前記絶縁油としては、脱塩素化処理等のPCB分解処理を行った後の絶縁油も好適に挙げられる。

【0061】

前記試料中の極性溶媒の濃度としては、前記抗PCBモノクローナル抗体のPCBに対する前記親和性が著しく劣化しない限り、特に制限はなく、例えば、1~20質量%であることが好ましく、10~20質量%であることがより好ましい。

なお、本発明の抗PCBモノクローナル抗体は、20質量%の極性溶媒を含む試料溶液中において、70~90%の親和性を有する。

【0062】

50

( P C B 測定用キット )

本発明の P C B 測定用キットは、本発明の抗 P C B モノクローナル抗体を含み、試料中の P C B を検出可能である限り、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記抗 P C B モノクローナル抗体、標識された前記抗 P C B モノクローナル抗体に対する二次抗体、標識された抗原 ( ハプテン ) としての P C B、緩衝液、検出試薬、及び標準試料 ( 例えば、カネクロール ) 等を含む。前記抗 P C B モノクローナル抗体は、標識されていてもよい。

また、前記 P C B 測定用キットとしては、例えば、前記抗 P C B モノクローナル抗体を含め、必要な試薬がフィルター等の担体に吸着されてなる免疫クロマトグラフィー用試験紙の形態であってもよい。

10

【実施例】

【 0 0 6 3 】

以下、本発明の実施例について説明するが、本発明はこの実施例に何ら限定されるものではない。

【 0 0 6 4 】

( 実施例 1 )

( 1 ) 抗体調製用化合物の合成

免疫原を有する前記抗体調製用化合物として、ハプテンとして 3 塩素化物 P C B ( 三塩化ビフェニル ) を、リンカーを介してキャリアタンパク質 ( スカシガイ由来のヘモシアニン ( 以下、「 K L H 」と表す ) ) に結合したものを以下の方法により合成した。該抗体調製用化合物の模式図は、図 1 に示すとおりである。

20

【 0 0 6 5 】

前記 3 塩素化物 P C B と、前記リンカーとからなる化合物 ( 以下、「 S 3 分子」という ) を水酸化ビフェニルへの塩素付加反応後、さらに  $\text{Br}(\text{CH}_2)_5\text{COOC}_2\text{H}_5$  を反応させ、さらに加水分解し、さらに活性エステル化することにより合成した。

得られた前記 S 3 分子 1 m g を 1 0 0  $\mu$  L のジメチルスルホキシド ( D M S O ) に溶解した。これを 3 m g の K L H を含む 9 m L の 1 0 0 m M ホウ酸緩衝液 ( p H 9 . 8 ) と混合し、これを一晩放置して、S 3 分子と K L H との複合体を作製した。次いで、未反応の S 3 分子を除くとともに、反応溶液をマウスの免疫に適した中性溶液にするために、脱塩カラム ( エコノパック 1 0 D G カラム、日本バイオ・ラッド社製 ) を用いて P B S 緩衝液 ( p H 7 . 0 ) に置換した。こうして前記抗体調製用化合物溶液を得た。

30

【 0 0 6 6 】

( 2 ) マウスの免疫

前記 ( 1 ) で調製した前記抗体調製用化合物を抗原として、マウス ( B u l b / c、メス、5 週齢 ) に免疫した。

初回免疫は、前記抗体調製用化合物 ( タンパク質量として約 0 . 3 m g ) を C o r i x a C o r p o r a t i o n 製の R I B I A d j u v a n t ( M P L + T D M E m u l s i o n ) に混合後、皮下注射した。該初回免疫の 2 週間後と 4 週間後に、同量の前記抗体調製用化合物を、C o r i x a C o r p o r a t i o n 製の R I B I A d j u v a n t ( M P L + T D M E m u l s i o n ) に混合後、皮下注射した。その後、1 週間以上経過した後、同量の前記抗体調製用化合物を、腹腔又は尾部静脈に注射し、その 4 ~ 5 日後に脾臓を摘出した。

40

【 0 0 6 7 】

( 3 ) ハイブリドーマの作製

前記 ( 2 ) で摘出した脾臓から調製した脾臓細胞を、R P M I 1 6 4 0 培地 ( I n v i t r o g e n 社製 ) で洗浄した後、ミエローマ細胞 N S 0 株 ( 理化学研究所 ) とともにポリエチレングリコール ( 重合度 1 , 5 0 0、日本ロシュ社製 ) 溶液中で 2 分間混合し、細胞融合を行った。前記ミエローマ細胞は、凍結保存されていたものを細胞融合実験の約 1 0 日前に解凍し、1 0 % 牛胎児血清を含む R P M I 1 6 4 0 培地を約 4 0 m L 添加して培養し、細胞融合の前日に培地交換を行った。

50

## 【0068】

融合反応後の融合細胞を、20%牛胎児血清を含むHAT培地約120mLに懸濁後、96穴マイクロプレート6枚に200 $\mu$ Lずつ分注した。

細胞融合の翌日及び5日後に100 $\mu$ Lの培養液を、20%牛胎児血清を含む新しいHAT培地に交換した。以後、ほぼ4日に1度の頻度で100 $\mu$ Lの培養液を、10%牛胎児血清を含む新しいHAT培地に交換した。

## 【0069】

## (4) ハイブリドーマのスクリーニング

## (a) 産生抗体分析用抗原ビーズの作製

図1に示す前記抗体調製用化合物と同じリンカーを有する二塩化フェノールを合成し、卵白アルブミン(OVA)との複合体を調製した。得られた複合体を、アガロースビーズ(NHS-activated Sepharose, Amersham Biosciences社製)に固定化し、産生抗体分析用抗原ビーズを調製した。前記産生抗体分析用抗原ビーズ約1mLに、前記複合体約0.1mgを固定化した後、10mg/mLの牛血清アルブミン(BSA)溶液1mLを用い、前記複合体が結合していないビーズ表面をブロッキングした。

10

## 【0070】

## (b) 蛍光光度計による測定

前記産生抗体分析用抗原ビーズに対し、0.25mL/分の流速で2分間(合計0.5mL)の前記ハイブリドーマ培養上清を作用させた。前記ハイブリドーマの培養上清は、細胞融合から2週間以上経過したものをを用いた。

20

前記産生抗体分析用抗原ビーズを、0.25mL/分の流速で0.5分間、PBS緩衝液によって洗浄した後、蛍光物質Cy5にて標識した二次抗体5nM(ヤギ抗マウスIgG抗体、Jackson Immunoresearch社製)を、0.25mL/分の流速で96秒間(計0.4mL)作用させた。

続いて、前記産生抗体分析用抗原ビーズをPBS緩衝液によって、0.25mL/分の流速で0.5分間、さらに1.5mL/分の流速で1.5分間洗浄した。

洗浄後、前記産生抗体分析用抗原ビーズ上に残った蛍光の強度を蛍光光度計(Sapidyne社製、KinExA 3000)を用いて測定し、前記ハイブリドーマ培養上清中、所望の抗PCBモノクローナル抗体の有無を判断した。

30

## 【0071】

測定の結果、抗PCBモノクローナル抗体を産生する安定なハイブリドーマが得られ、これをSk3A11株とした。

前記Sk3A11株細胞は、メチルセルロース培地を用いて単一の細胞に由来するコロニーを形成させた後、該コロニーを液体培地に移し、培養を続けた。

## 【0072】

## (5) 抗PCBモノクローナル抗体の作製

前記(4)で樹立したハイブリドーマSk3A11株のコロニーを、24穴プレート上のRPMI1640培地を基本とするHAT培地に移し4日間培養した後、培養液の一部を10mLの前記HAT培地を入れた50mLの角形フラスコに移し、コンフルエントに達する直前まで培養し、Sk3A11株によって分泌された抗体を培養上清からプロテインAを用いたアフィニティクロマトグラフィーによって精製し、抗PCBモノクローナル抗体(以下、「Sk3A11抗体」という)を得た。

40

## 【0073】

## (6) 抗PCBモノクローナル抗体の評価

前記(5)で得た抗PCBモノクローナル抗体(Sk3A11抗体)0.3mg/mLは、50倍希釈したものを抗体溶液とし、PCBの測定に用いた。

また、比較対象として、市販の抗PCB抗体(RDI社製、PCB35、以下「RDI抗体」という)を用いた。前記RDI抗体は、0.1%BSAを含むPCB緩衝液を用いて2,000倍に希釈したものを抗体溶液とし、PCBの測定に用いた。

50

## 【0074】

PCBの標準試料として、カネクロール（KC-300、KC-400、KC-500）を測定対象とした。前記カネクロールはDMSOを用いて希釈し、2% DMSOで測定を行う場合には、前記カネクロールを含むDMSO溶液20μLと、PBS緩衝液480μLとを混合したものに、前記抗体溶液500μLを加えて1mLとした測定試料を調製した。

## 【0075】

該測定試料を、抗原を固定化したビーズ（以下、「抗原ビーズ」という）に供給し、前記（4）と同様にして蛍光光度計（Sapidyne社製、KinExA 3000）を用いて測定し、親和性、交差反応性を評価した。

10

なお、蛍光標識以外の標識由来の信号強度を測定することによっても、得られた値から以下の方法により親和性及び交差反応性を求め、定量することができる。

具体的には、前記標識が金コロイドの場合には、前記担体の透過光量を信号強度とし、透過光量測定装置（例えば、柴田科学社製、Imny等）を用いて測定することができる。

## 【0076】

## (i) 親和性の測定

前記抗PCBモノクローナル抗体について、異なる塩素数のPCBを含む各カネクロールとの親和性を比較するために、蛍光光度計による測定データを近似式に当てはめ、 $IC_{50}$ 値を求めた。前記近似式として、下記式（1）を用いた。

20

## 【0077】

## 【数1】

$$y = 99 / (1 + (x/P1)^{P2}) + 0.5 \quad \text{式(1)}$$

前記式（1）中、 $y$ は、試料中に抗原（PCB）を加えなかったときの蛍光強度の値を100%とした時の相対的な蛍光強度を表し、 $x$ は、抗原濃度を表し、 $P1$ と $P2$ は、近似のパラメータを表す。

## 【0078】

なお、 $IC_{50}$ 値に対して抗体濃度が十分に小さい時（例えば、10分の1以下の時）、 $IC_{50}$ 値と平衡解離定数（ $Kd$ ）とがほぼ一致することが知られているため、親和性の評価として、該平衡解離定数（ $Kd$ ）を用いた。

30

## 【0079】

カネクロールを含まない2% DMSO溶液中の前記抗PCBモノクローナル抗体と、前記抗原ビーズとの結合量を100として、濃度を変えたカネクロールを含む2% DMSO溶液中の前記抗PCBモノクローナル抗体と、前記抗原ビーズとの結合量の測定結果を、図2～5に示す。また、図2～5の結果から求めた平衡解離定数（ $Kd$ 値）を、下記表2に示す。

## 【0080】

## (ii) 交差反応性

交差反応性は、それぞれ、下記式により算出した。結果を下記表2に示す。

$$Sk3A11の交差反応性(%) = (KC300のIC_{50}値 / 試料のIC_{50}値) \quad \dots \text{式(2)}$$

40

$$RDIの交差反応性(%) = (KC300のIC_{50}値 / 試料のIC_{50}値)$$

...式(3)

## 【0081】

【表 2】

	Kd (ppb)		交差反応性 (%)	
	Sk3A11	RDI	Sk3A11	RDI
KC-300	0.7	17.6	100	5.1
KC-400	1.9	6.2	37	15
KC-500	7.2	1.7	9.7	53
KC-600	21.4	0.9	3.3	100

10

## 【0082】

図2～5、及び表2の結果から、Sk3A11抗体は、3塩素化物PCBを最も多く含有するKC-300に対して最も強い親和性を示し、その親和性の強さはRDI抗体の約25倍であった。KC-400に対する親和性もSk3A11抗体の方がRDI抗体よりも約3.3倍強かった。一方、KC-500とKC-600に対する親和性は、RDI抗体の方がSk3A11抗体よりも強く、特にKC-600に対しては、RDI抗体の方がSk3A11抗体よりも約24倍強いことがわかった。

## 【0083】

また、図2に示されたように、RDI抗体は、KC-300濃度1ppb以下では、KC-300を全く含まない試料と同じ相対信号値100%を示しているのに対し、Sk3A11抗体は、1ppbのKC-300に対して相対信号値約50%を示しており、かつ0.1ppmを下回る濃度においても相対信号値の変化がみられる。このことは、RDI抗体では1ppb以下のKC-300を測定できないのに対し、Sk3A11抗体は、0.1～1ppb以下のKC-300を測定できることを示している。

20

これらの結果から、本発明の抗PCBモノクローナル抗体(Sk3A11抗体)は、従来の抗PCB抗体において検出が困難であった3塩素化物PCBを高感度に測定可能な抗体として有用であることがわかった。

## 【0084】

## (実施例2)

前記免疫原を有する前記抗体調製用化合物として、ハプテンとして四塩化ビフェニルを用い、ハイブリドーマSzk2E4株を得て、これを培養して抗体を作製した以外は、実施例1と同様にして抗PCBモノクローナル抗体を作製し、得られた抗PCBモノクローナル抗体(以下、「Szk2E4抗体」という)を用いて、カネクロールに対する親和性及び交差反応性を評価した。

30

また、実施例1と同様に、比較対象として、RDI抗体を用いた。結果を図6～8、及び表3に示す。

## 【0085】

【表 3】

	Kd (ppb)		交差反応性 (%)	
	Szk2E4	RDI	Szk2E4	RDI
KC-300	10.8	17.6	100.0	9.4
KC-400	30.4	6.2	35.5	27.0
KC-500	35.5	1.7	30.4	100.0
KC-600	212.0	1.8	5.1	93.8

40

## 【0086】

- ジメチルスルホキシド(DMSO)に対する耐性 -

Szk2E4抗体とRDI抗体のDMSOに対する耐性を比較した。

50

DMSO濃度の異なる抗体の溶液を調製し、実施例1と同様にして前記抗原ピーズに供給し、該抗原ピーズに固定された抗原に対する結合性を測定した。

RDI抗体は、6%以上のDMSOが存在する溶液中において前記抗原に対する結合性が低下し、20%DMSO存在下では測定に利用できなかったのに対し、Szk12E4抗体は、20%のDMSOが存在する溶液中においても、前記抗原に対する結合性を保っていた。結果を図9に示す。

【0087】

図6~8の結果から、Szk2E4抗体は、3塩素化物PCBを最も多く含有するKC-300に対して最も強い親和性を示し、その親和性がRDI抗体よりも強いことがわかり、さらに図9の結果から、Szk2E4抗体は、極性溶媒に対する高い耐性を示すことがわかった。また、表3の結果からも、塩素数の少ないPCBにより強い親和性を示すことが明らかとなり、本発明の抗PCBモノクローナル抗体(Szk2E4抗体)は、従来の抗PCB抗体において検出が困難であった三塩化ビフェニル等の塩素数が少ない低塩素化物PCBを高感度に測定可能な抗体として有用であることがわかった。

【産業上の利用可能性】

【0088】

本発明の抗PCBモノクローナル抗体は、三塩化ビフェニル等の塩素数が少ない低塩素化物PCBに対する特異性が高く、かつ極性溶媒存在下においてPCBとの結合性が低下することなく、三塩化ビフェニルを多く含むPCB(例えば、鐘淵化学工業製のカネクロール300(KC300)、及び三菱モンサント(現三菱化学)製のアロクロール1242(Ar.1242)などに由来するPCB)を高感度で定量であるため、組成が未知の絶縁油等、特に低塩素化物PCBを多量に含有する可能性のある検査対象を、最小限の誤差で高感度に検出、定量することができ、廃棄物処理後のPCB残留濃度、環境中のPCB濃度等の検査に好適に使用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0089】

【図1】図1は、本発明の抗PCBモノクローナル抗体の作製に用いられる抗原の一例を示す概略図である。

【図2】図2は、実施例1で測定したKC-300に対する本発明の抗PCBモノクローナル抗体(Sk3A11、印)、及び他の抗PCBモノクローナル抗体(RDI、印)の結合曲線である。

【図3】図3は、実施例1で測定したKC-400に対する本発明の抗PCBモノクローナル抗体(Sk3A11、印)、及び他の抗PCBモノクローナル抗体(RDI、印)の結合曲線である。

【図4】図4は、実施例1で測定したKC-500に対する本発明の抗PCBモノクローナル抗体(Sk3A11、印)、及び他の抗PCBモノクローナル抗体(RDI、印)の結合曲線である。

【図5】図5は、実施例1で測定したKC-600に対する本発明の抗PCBモノクローナル抗体(Sk3A11、印)、及び他の抗PCBモノクローナル抗体(RDI、印)の結合曲線である。

【図6】図6は、実施例2で測定したKC-300に対する本発明の抗PCBモノクローナル抗体(Szk2E4、印)、及び他の抗PCBモノクローナル抗体(RDI、印)の結合曲線である。

【図7】図7は、実施例2で測定したKC-400に対する本発明の抗PCBモノクローナル抗体(Szk2E4、印)、及び他の抗PCBモノクローナル抗体(RDI、印)の結合曲線である。

【図8】図8は、実施例2で測定したKC-400に対する本発明の抗PCBモノクローナル抗体(Szk2E4、印)、及び他の抗PCBモノクローナル抗体(RDI、印)の結合曲線である。

【図9】図9は、実施例2で測定したジメチルスルホキシド(DMSO)に対する耐性の

10

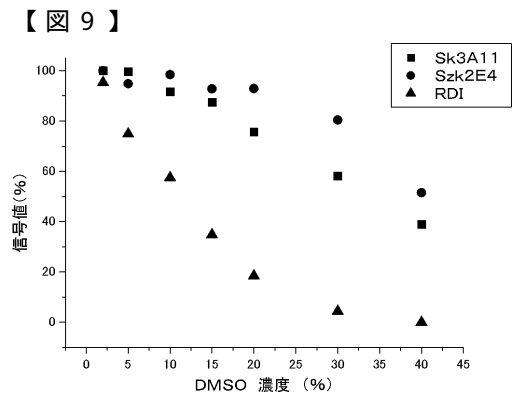
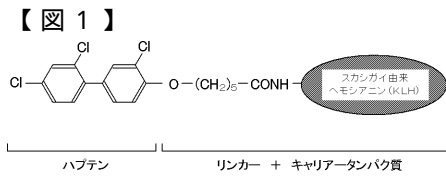
20

30

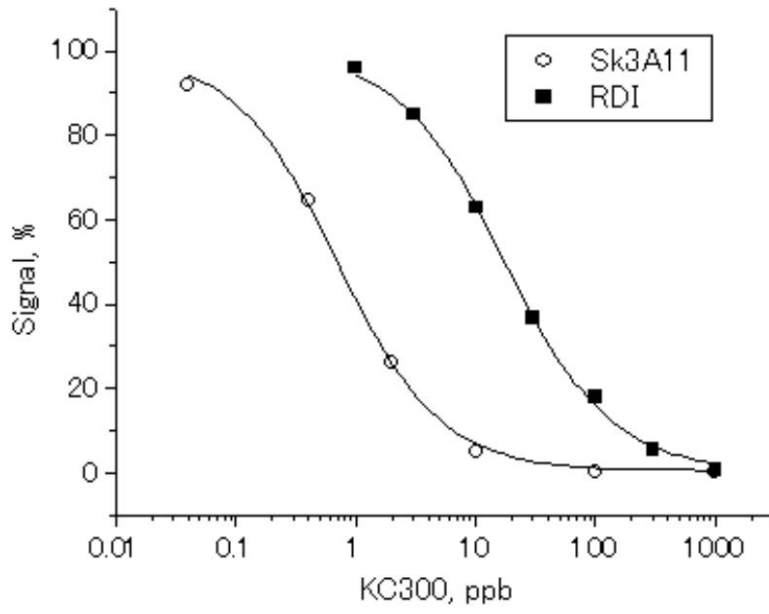
40

50

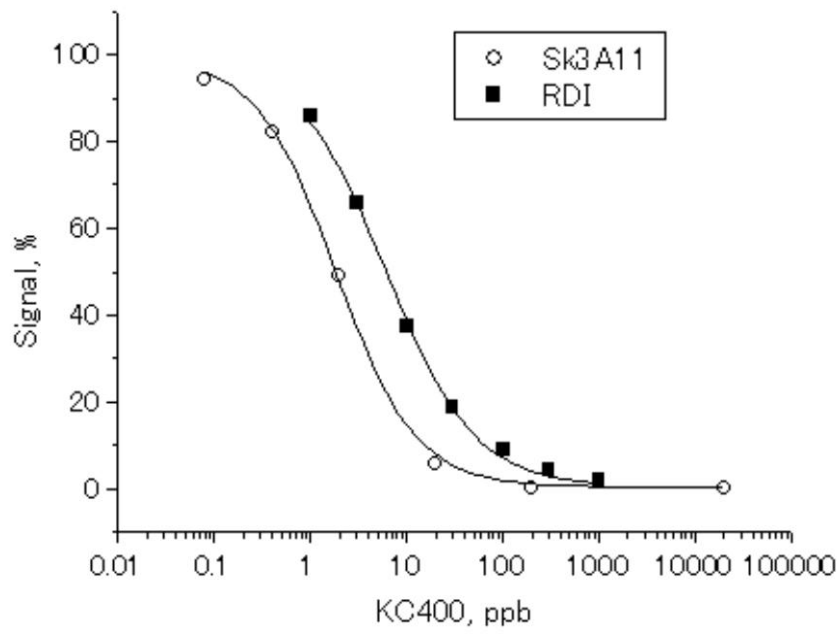
結果を示すグラフである。DMSOが抗体と抗原の結合に与える影響を蛍光光度計によって測定した。DMSOを含まない溶液中の抗体と抗原ビーズの結合量を100%として、横軸濃度のDMSOを含む溶液中の抗体と抗原ビーズの結合量をグラフに示した。



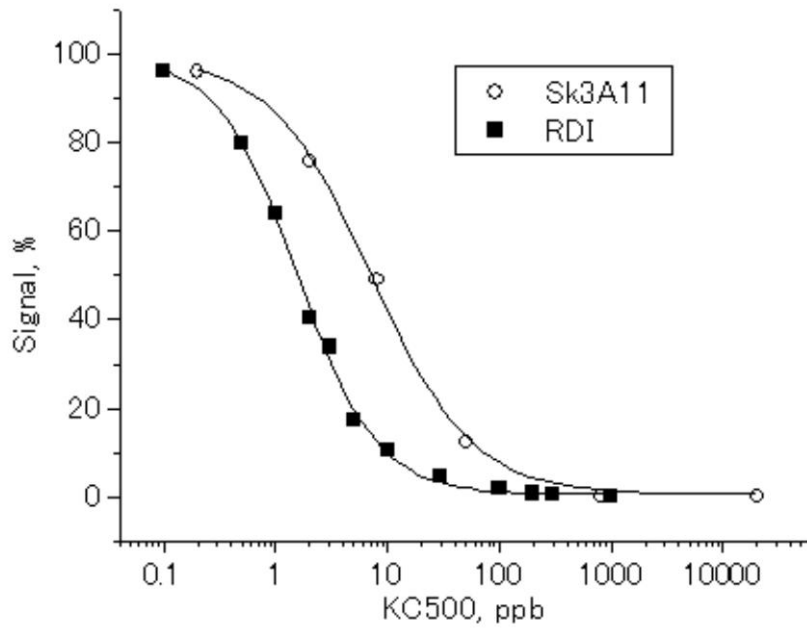
【 図 2 】



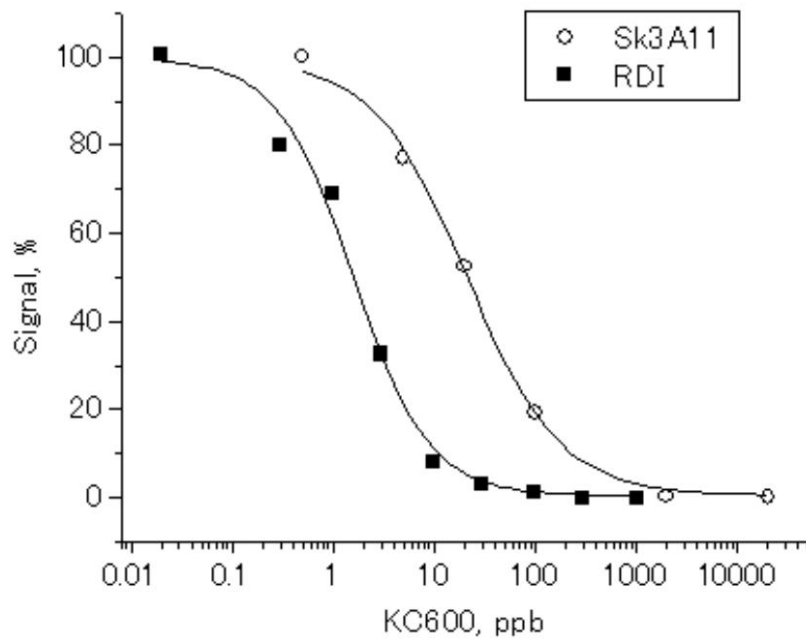
【 図 3 】



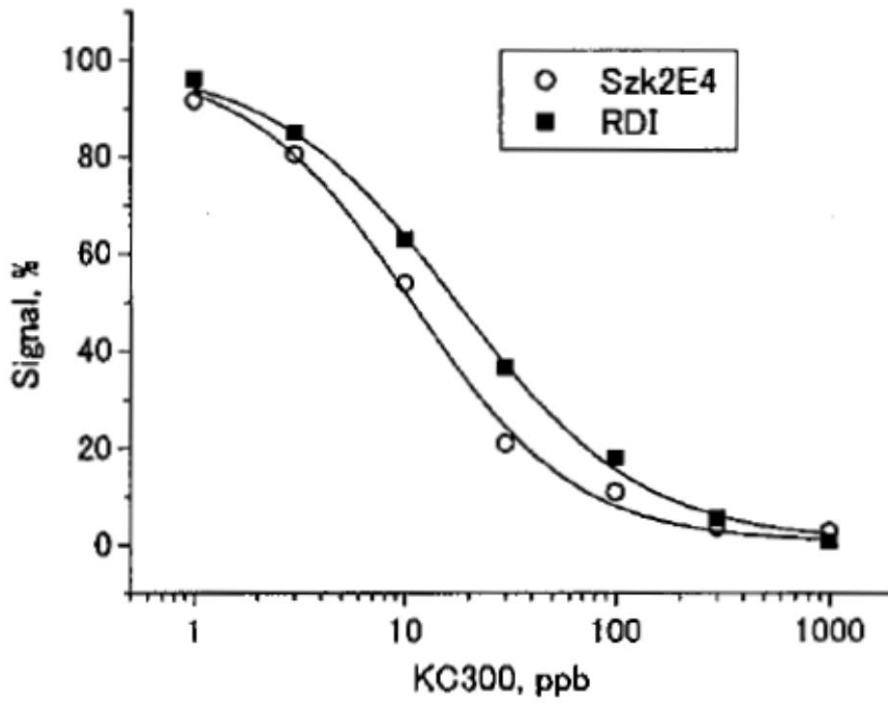
【 4 】



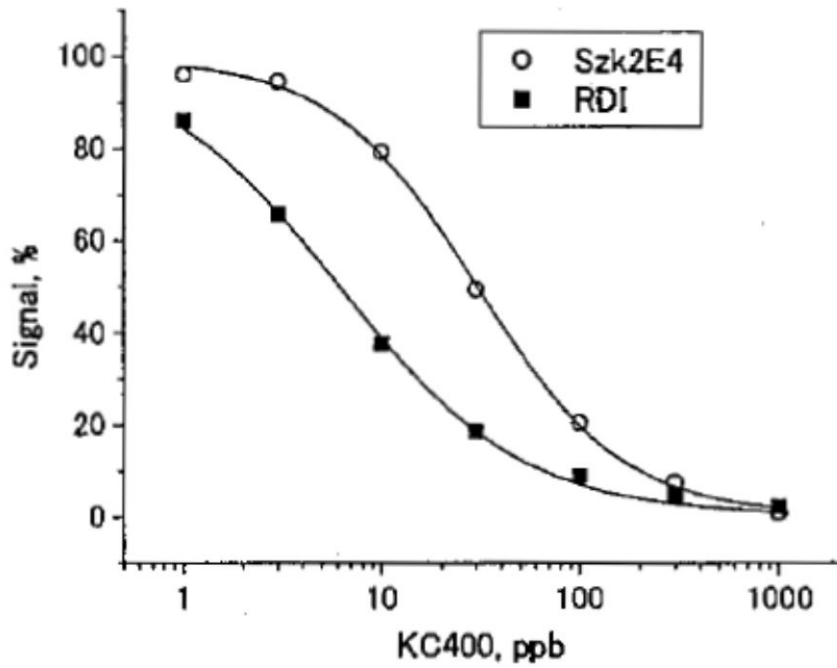
【 5 】



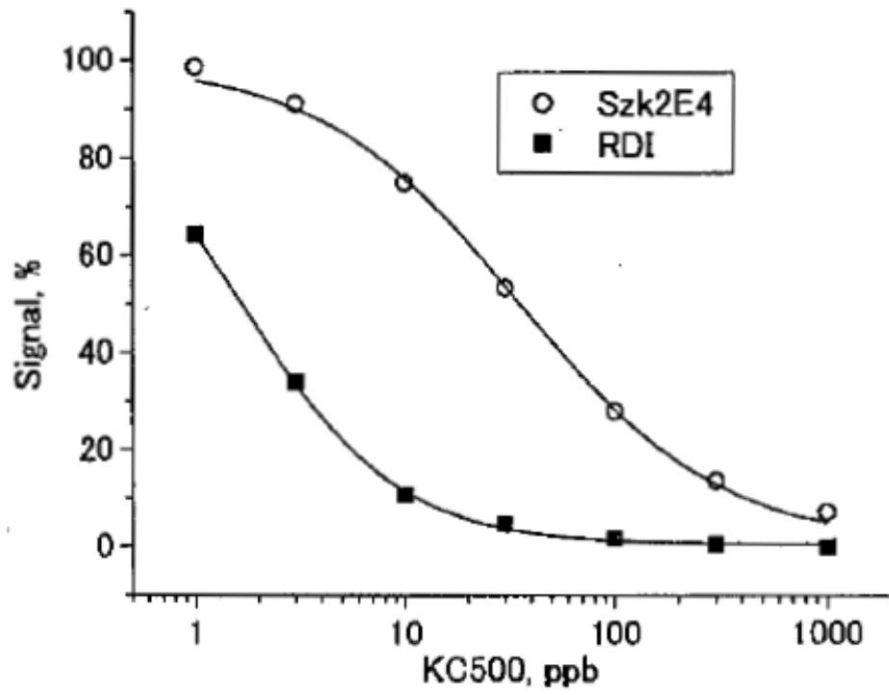
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
F 2 3 G 7/00 (2006.01) F 2 3 G 7/00 E

審査官 石丸 聡

(56)参考文献 特開2000-191699(JP,A)  
特開2005-247822(JP,A)  
Analytica Chimica Acta, 2004, Vol.517, p.161-168  
環境化学, 2004, Vol.14, p.791-803

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6  
C A / B I O S I S / M E D L I N E / W P I D S ( S T N )  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I )

专利名称(译)	抗PCB单克隆抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP4926497B2</a>	公开(公告)日	2012-05-09
申请号	JP2006050224	申请日	2006-02-27
申请(专利权)人(译)	财团法人电力中央研究所		
当前申请(专利权)人(译)	财团法人电力中央研究所		
[标]发明人	佐々木和裕 大村直也		
发明人	佐々木 和裕 大村 直也		
IPC分类号	C12P21/08 C07K16/44 C12N5/10 G01N33/577 G01N33/53 F23G7/00		
FI分类号	C12P21/08 C07K16/44 C12N5/00.101 G01N33/577.B G01N33/53.S F23G7/00.E C07K14/435 C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/12		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CB30 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/BB13 4B065/CA25 4B065/CA44 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	广田幸一		
审查员(译)	石丸聪		
优先权	2005357433 2005-12-12 JP		
其他公开文献	JP2007186488A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

一个三个高特异性低氯化PCB氯原子更少，如多氯联苯，和没有用于PCB亲和力在极性溶剂存在下降低时，PCB富三氯化联苯敏感具有优异定量性的抗PCB单克隆抗体，制备抗PCB单克隆抗体的方法，以及使用该抗PCB单克隆抗体的PCB测量方法。通过使用具有由以下结构式(1)表示的结构的化合物，和包括培养的杂交瘤生产的抗PCB单克隆抗体以获得所述化合物作为抗原产生的抗PCB单克隆抗体方法，使用抗PCB单克隆抗体的PCB测量方法。嵌入图片在结构式(1)中，n表示1~20的整数，表示的M1，M2，0~2的整数，并且，M1的总和和m2为1~4，X是蛋白质代表。系统技术领域

