

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-26704

(P2004-26704A)

(43) 公開日 平成16年1月29日(2004.1.29)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07D 311/82	C07D 311/82	4B024
C07K 14/00	C07K 14/00	4B064
C07K 16/44	C07K 16/44	4B065
C12N 5/10	GO1N 33/53 S	4C062
C12N 15/02	GO1N 33/531 A	4H045
審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 21 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-184307 (P2002-184307)	(71) 出願人	303010452 株式会社LTTバイオフーマ 東京都港区愛宕2丁目5番1号
(22) 出願日	平成14年6月25日 (2002.6.25)	(71) 出願人	000006127 森永乳業株式会社 東京都港区芝5丁目33番1号
		(74) 代理人	100089244 弁理士 遠山 勉
		(74) 代理人	100090516 弁理士 松倉 秀実
		(74) 代理人	100100549 弁理士 川口 嘉之
		(72) 発明者	檜垣 憲 東京都世田谷区上北沢一丁目28番24-304号
最終頁に続く			

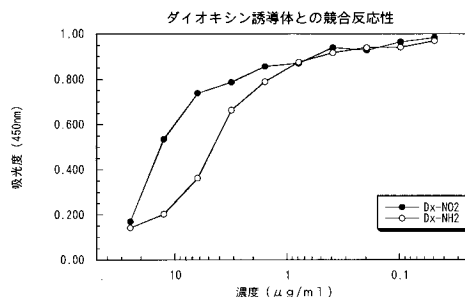
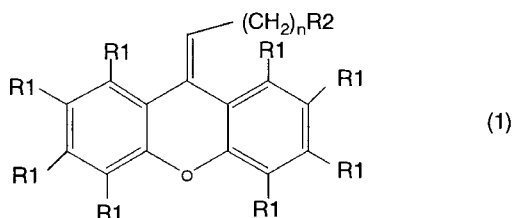
(54) 【発明の名称】 新規ハプテン抗原、並びにモノクローナル抗体及びそれを用いたダイオキシンの検出方法

(57) 【要約】

【課題】 安全性に優れ、かつ、種々の塩素化ダイオキシン類について識別性の優れた抗体を取得するためのダイオキシン類のハプテン抗原を提供する。

【解決手段】 下記の一般式(1)

【化1】



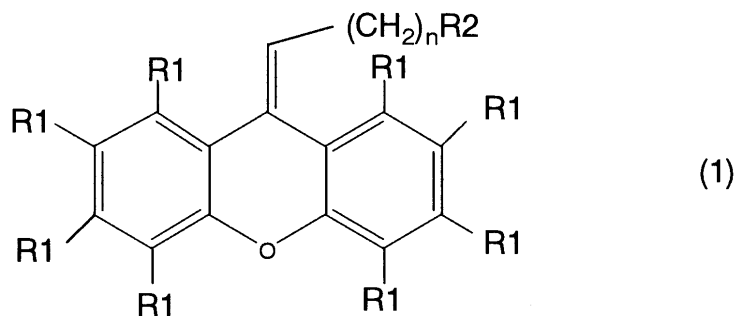
(ただし、一般式(1)中、nは1~20までのいずれかの整数を示し、R1はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、アミノ基、ニトロ基又はメチル基を示し、R2は水酸基、カルボキシルアシルオキシ基、カルボキシル基、アミノ基又はチオール基を示す。)により表される化合物。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の一般式(1)

【化 1】



10

(ただし、一般式(1)中、nは1~20までのいずれかの整数を示し、R1はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、アミノ基、ニトロ基又はメチル基を示し、R2は水酸基、カルボキシルアシルオキシ基、カルボキシル基、アミノ基又はチオール基を示す。)により表される化合物。

【請求項 2】

一般式(1)のうち、R1が水素原子又はハロゲン原子であり、R2が水酸基又はカルボキシルアシルオキシ基である請求項1に記載の化合物。

20

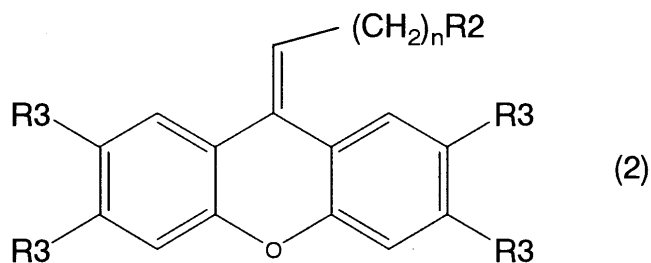
【請求項 3】

一般式(1)のうち、R1が水素原子又は塩素原子である請求項1又は2に記載の化合物。

【請求項 4】

下記の一般式(2)

【化 2】



30

(ただし、一般式(2)中、nは1~20までのいずれかの整数を示し、R3はハロゲン原子を示し、R2は水酸基又はカルボキシルアシルオキシ基を示す。)により表される化合物。

【請求項 5】

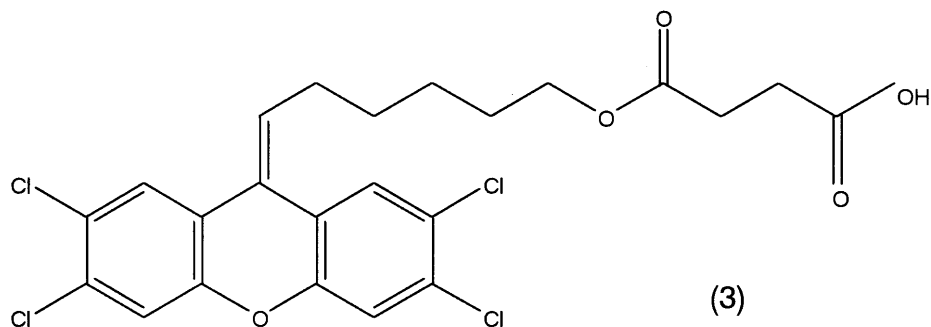
一般式(2)のうち、R3が塩素原子である請求項4に記載の化合物。

【請求項 6】

下記の式(3)の構造を有する化合物。

40

【化 3】



10

【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載された化合物と高分子化合物との複合体。

【請求項 8】

高分子化合物がタンパク質である請求項 7 に記載の複合体。

【請求項 9】

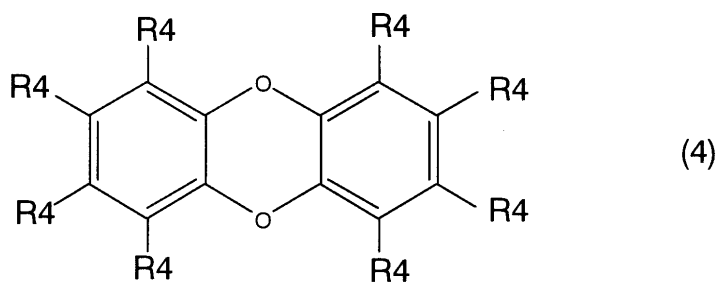
高分子化合物がウシ血清アルブミン又はウシガンマグロブリンである請求項 7 又は 8 に記載の複合体。

【請求項 10】

請求項 7 から 9 のいずれか一項に記載の複合体を抗原として用いることを特徴とする、一般式 (4)

20

【化 4】



30

(ただし、一般式 (4) 中、R4 はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、アミノ基又はニトロ基を示す。) で表され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 11】

一般式 (4) で表され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 12】

抗体がモノクローナル抗体である請求項 11 に記載の抗体又はそのフラグメント。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 14】

寄託番号 FERMP-18827 で寄託されている請求項 13 に記載のハイブリドーマ。

40

【請求項 15】

請求項 11 もしくは 12 に記載の抗体又はそのフラグメントを用いることを特徴とする、一般式 (4) で表される化合物の免疫化学的測定方法。

【請求項 16】

さらに、請求項 7 から 9 のいずれか一項に記載の複合体を用いることを特徴とする、請求項 15 に記載の免疫化学的測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

50

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規ハプテン抗原に関する。詳しくは、ジベンゾパラダイオキシシン（以下、ダイオキシシンと略記する。）類に対する抗体を取得するための新規ハプテン抗原に関する。本発明は又、該ハプテン抗原に対する抗体として取得されたダイオキシシン類に対する抗体、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体を用いたダイオキシシン類の免疫化学的測定方法に関する。

【0002】**【従来の技術】**

近年、生体に極めて重大な影響を及ぼす毒性化学物質であるダイオキシシン類による環境汚染が問題となってきており、環境又は生体中などにおけるダイオキシシン類を測定し、汚染状況を調査することが急務となってきている。そのため、環境又は生体中などにおけるダイオキシシン類を測定するための方法の開発が進められている。

10

【0003】

ダイオキシシン類の測定方法の一つとして、免疫化学的測定方法がある。免疫化学的測定方法においては、ダイオキシシン類の抗体を用いて試料中のダイオキシシン類の濃度を測定する。しかしながら、ダイオキシシン類は低分子であり、そのままでは抗体産生が起こらないハプテン（免疫原性がない）であるため、ダイオキシシン類の抗体を作製するにはハプテンをキャリアータンパク質〔ウシ血清アルブミン（BSA）、ウシガンマグロブリン（BGG）など〕などの高分子化合物と結合させ、免疫原とする必要がある。

【0004】

このような方法として、特開昭63-14691号には、1-アミノ-3,7,8-トリクロロジベンゾ-p-ダイオキシシンをキャリアータンパクに結合させて得たハプテン抗原を用いてモノクローナル抗体を取得すること、又、該モノクローナル抗体を用いたダイオキシシン類の検出方法が開示されている。

20

【0005】

また、特開昭63-74494号には、塩素化ジベンゾ-p-ダイオキシシンとキャリアーの免疫複合体を用いて抗体を取得すること、又、該モノクローナル抗体を用いたダイオキシシン類の分析方法が開示されている。

【0006】

また、特開2002-119279号には、塩素化ジベンゾ-p-ダイオキシシンとキャリアーを結合させた抗原を用いて抗体を取得すること、又、該モノクローナル抗体を用いたダイオキシシン類の分析方法が開示されている。

30

【0007】

これらの方法を含む、従来のダイオキシシン類の免疫化学的測定方法で用いられる、ダイオキシシン類に対する抗体を取得するために用いられている既知のハプテン-キャリアータンパク質複合体免疫原では、ダイオキシシン骨格の炭素に側鎖を導入し、その末端にキャリアータンパク質を結合させている。

【0008】

ところで、環境中で問題となっているダイオキシシン類は、多塩素化ダイオキシシンであり、その塩素化されている位置および数が異なる多数の類縁体が存在する。既知のダイオキシシンハプテン抗原は、ダイオキシシン骨格の塩素の付く位置に側鎖を導入しているため、このようなハプテン-キャリアー複合体免疫原から作製された抗体は、種々の塩素化ダイオキシシンの識別性に問題があると考えられる。

40

【0009】

また、人体および環境などに対する危険性の点で、ダイオキシシン骨格において4個以上の塩素で置換されたダイオキシシン抗原を作製することは望ましくないと考えられる。

【0010】

したがって、安全性に優れ、かつ、種々の塩素化ダイオキシシン類について識別性の優れた抗体を取得するためのダイオキシシン類のハプテン抗原の開発が望まれていた。

【0011】

50

【発明が解決しようとする課題】

本願発明は、上記課題を解決することを目的とし、安全性に優れ、かつ、種々の塩素化ダイオキシン類について識別性の優れた抗体を取得するためのダイオキシン類のハプテン抗原を提供することを課題とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、ハプテン部分にダイオキシン骨格ではなくダイオキシン類の類似構造体であるキサントレン骨格を有するハプテン抗原を用いて、塩素化ダイオキシン類に対する抗体を取得することに成功し、発明を完成するに至った。

10

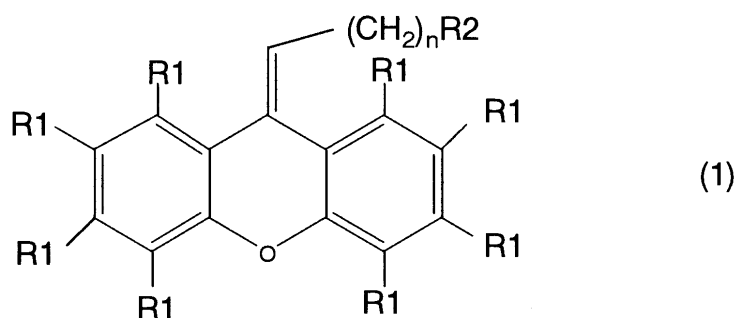
【0013】

本発明は上記のようにしてなされたものであり、本発明の要旨は以下の通りである。

(1) 下記的一般式(1)

【0014】

【化5】



20

【0015】

(ただし、一般式(1)中、nは1~20までのいずれかの整数を示し、R1はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、アミノ基、ニトロ基又はメチル基を示し、R2は水酸基、カルボキシルアシルオキシ基、カルボキシル基、アミノ基又はチオール基を示す。)により表される化合物。

(2) 一般式(1)のうち、R1が水素原子又はハロゲン原子であり、R2が水酸基又はカルボキシルアシルオキシ基である(1)に記載の化合物。

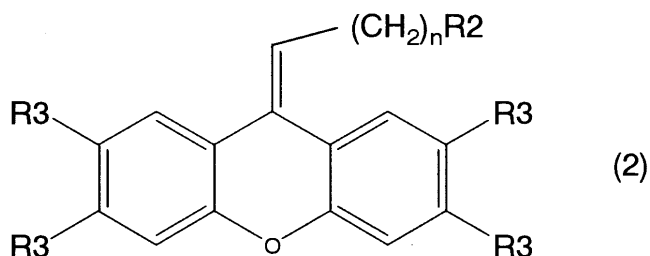
30

(3) 一般式(1)のうち、R1が水素原子又は塩素原子である(1)又は(2)に記載の化合物。

(4) 下記的一般式(2)

【0016】

【化6】



40

【0017】

(ただし、一般式(2)中、nは1~20までのいずれかの整数を示し、R3はハロゲン原子を示し、R2は水酸基又はカルボキシルアシルオキシ基を示す。)により表される化合物。

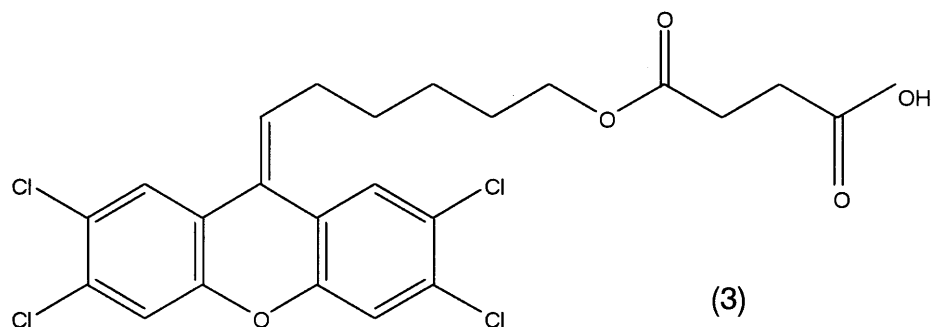
(5) 一般式(2)のうち、R3が塩素原子である(4)に記載の化合物。

(6) 下記の式(3)の構造を有する化合物。

50

【0018】

【化7】



10

【0019】

(7) (1)から(6)のいずれかに記載された化合物と高分子化合物との複合体。

(8) 高分子化合物がタンパク質である(7)に記載の複合体。

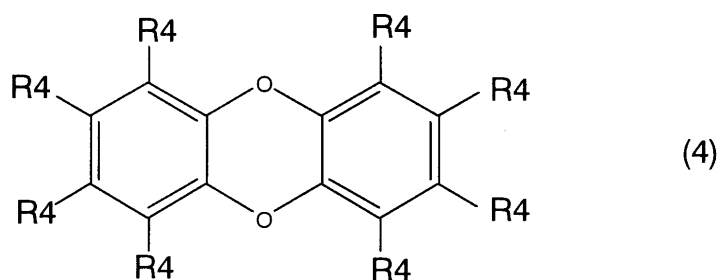
(9) 高分子化合物がウシ血清アルブミン又はウシガンマグロブリンである(7)又は(8)に記載の複合体。

(10) (7)から(9)のいずれかに記載の複合体を抗原として用いることを特徴とする、一般式(4)

【0020】

20

【化8】



30

【0021】

(ただし、一般式(4)中、R4はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、アミノ基又はニトロ基を示す。)で表され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。

(11) 一般式(4)で表される化合物に反応性を示す抗体又はそのフラグメント。

(12) 抗体がモノクローナル抗体である(11)に記載の抗体又はそのフラグメント

(13) (12)に記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

(14) 寄託番号FERM P-18827で寄託されている(13)に記載のハイブリドーマ。

(15) (11)もしくは(12)に記載の抗体又はそのフラグメントを用いることを特徴とする、一般式(4)で表される化合物の免疫化学的測定方法。

40

(16) さらに、(7)から(9)のいずれかに記載の複合体を用いることを特徴とする、(15)に記載の免疫化学的測定方法。

【0022】

【発明の実施の形態】

以下に、本発明を詳細に説明する。

(1) 本発明のハプテン抗原

本発明のハプテン抗原は、ハプテン部分がダイオキシソキシソ骨格ではなく、ダイオキシソキシソ類の類似構造体であるキサソキシソ骨格を有する化合物であり、塩素化ダイオキシソキシソ類に対する抗体を取得するための免疫原となる化合物である。本発明のハプテン抗原のハプテン部分

50

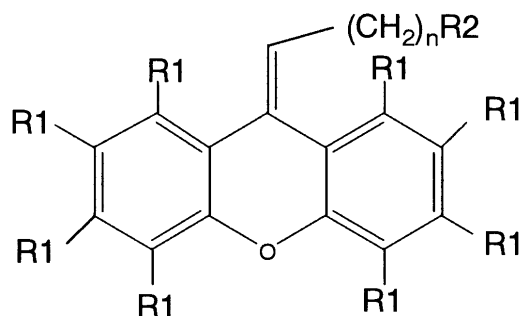
はキサンテン骨格を有する化合物であり、ダイオキシン骨格の塩素化されない酸素原子位置に相当する、キサンテン骨格の 9 位の炭素の位置に側鎖を導入したことに特徴があり、種々の塩素化ダイオキシンの識別性に優れた抗体を取得するための免疫原となり得る。

【0023】

本発明のハプテンは、下記の一般式(1)

【0024】

【化9】



10

【0025】

(ただし、一般式(1)中、nは1~20までのいずれかの整数を示し、R1はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、アミノ基、ニトロ基又はメチル基を示し、R2は水酸基、カルボキシルアシルオキシ基、カルボキシル基、アミノ基又はチオール基を示す。)により表される化合物である。

20

【0026】

nは、好ましくは2~10、より好ましくは4~8までのいずれかの整数である。

R1は、それぞれ独立であって、置換基の位置および種類などは特に限定されない。R1の具体例としては、水素原子、塩素原子、臭素原子、アミノ基、ニトロ基、メチル基などが好ましく例示できる。

R2のうち、カルボキシルアシルオキシ基の炭素数としては好ましくは3~6までのいずれかの整数である。R2の具体例としては、水酸基、カルボキシルプロピオニルオキシ基、カルボキシルパレイルオキシ基、カルボキシル基、アミノ基又はチオール基などが好ましく例示できる。

30

【0027】

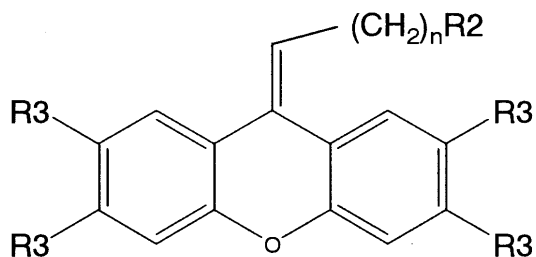
本発明のハプテンは、好ましくは、一般式(1)のうち、R1が水素原子又はハロゲン原子であり、R2が水酸基又はカルボキシルアシルオキシ基である化合物である。本発明のハプテンは、好ましくは、一般式(1)のうち、R1が水素原子又は塩素原子である化合物である。

【0028】

本発明のハプテンは、好ましくは、下記の一般式(2)

【0029】

【化10】



40

【0030】

(ただし、一般式(2)中、nは1~20までのいずれかの整数を示し、R3はハロゲン原子を示し、R2は水酸基又はカルボキシルアシルオキシ基を示す。)により表される化

50

合物である。

n は、好ましくは 2 ~ 10、より好ましくは 4 ~ 8 までのいずれかの整数である。

R 3 の具体例としては、塩素原子、臭素原子などが好ましく例示できる。

R 2 のうち、カルボキシルアシロキシ基の炭素数としては好ましくは 3 ~ 6 までのいずれかの整数である。R 2 の具体例としては、水酸基、カルボキシルプロピオニルオキシ基、カルボキシルパレイルオキシ基などが好ましく例示できる。

本発明のハプテンは、好ましくは、一般式 (2) のうち、R 3 が塩素原子である化合物である。

【 0 0 3 1 】

本発明のハプテンの具体例としては、コハク酸モノ 6 - (2 , 3 , 6 , 7 - テトラクロロキサンテン - 9 - イリデン) ヘキシル、アジピン酸モノ 8 - (2 , 3 , 6 , 7 - テトラクロロキサンテン - 9 - イリデン) オクチルなどが好ましく例示できる。

【 0 0 3 2 】

本発明のハプテンは、常法 ([医薬品の開発、第 10 巻診断薬、第 3 章、廣川書店]、[生化学実験法 11 - エンザイムイムノアッセイ、12 章、東京化学同人] 等) に従って、高分子化合物と結合させ、塩素化ダイオキシソリン類に対する抗体を取得するための免疫原とすることができる。高分子化合物としては、タンパク質が好ましく例示できる。このようにハプテンと結合させて免疫原を作製するためのタンパク質をキャリアタンパク質と称する。キャリアタンパク質としては、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシガンマグロブリンなどが好ましく例示できる。

【 0 0 3 3 】

本発明のハプテン抗原は、ダイオキシソリン類に対する抗体の免疫原となるにも関わらず、ハプテン部分にダイオキシソリン骨格を有しない化合物を用いた新規なハプテン抗原である。

【 0 0 3 4 】

(2) 本発明のハプテン抗原の製造方法

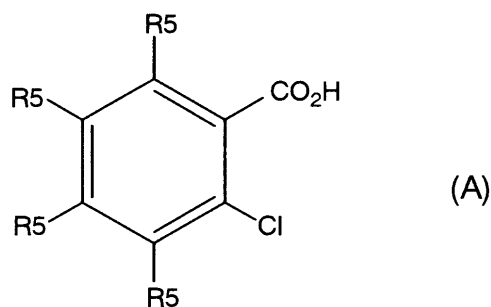
本発明のハプテン抗原のハプテン部分は、キサンテン骨格を有し、ダイオキシソリン類の有するダイオキシソリン骨格において塩素化されない酸素原子位置に相当する、キサンテン骨格の 9 位の炭素の位置に側鎖が導入されていることを特徴とする。

【 0 0 3 5 】

本発明のハプテンは、例えば、下記の方法により得られる。式 (A) で表される化合物

【 0 0 3 6 】

【 化 1 1 】



【 0 0 3 7 】

(R 5 は、それぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、アミノ基、ニトロ基又はメチル基を示す。) (ただしアミノ基の場合は保護基をつける。) 及び式 (B) で表される化合物

【 0 0 3 8 】

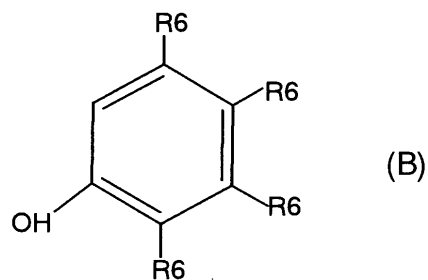
【 化 1 2 】

10

20

30

40

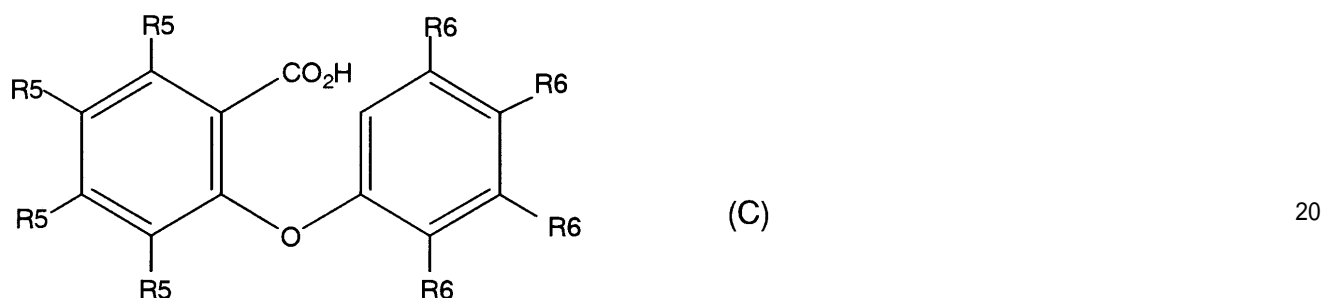


【 0 0 3 9 】

(R 6 は、それぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、アミノ基又はメチル基を示す。) (10
 ただしアミノ基の場合は保護基をつける。) とを、有機溶媒中、炭酸カリウム、銅粉および
 沃化銅存在下、加温下で反応させ、式 (C) で表される化合物を得る。

【 0 0 4 0 】

【 化 1 3 】



【 0 0 4 1 】

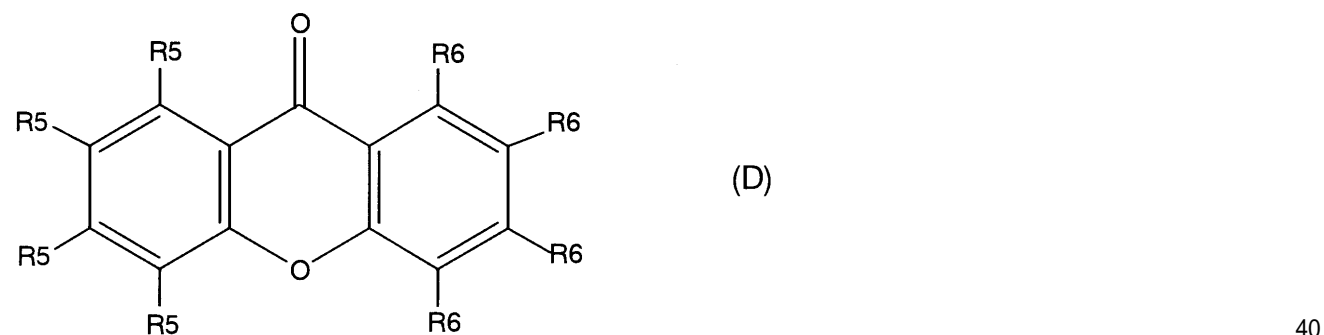
(R 5 および R 6 は、前記と同義である。) (ただしアミノ基の場合は保護基をつける。)

【 0 0 4 2 】

式 (C) で表される化合物に、塩化チオニル、次いで塩化アルミニウムを反応させ、式 (30
 D) で表される化合物を得る。

【 0 0 4 3 】

【 化 1 4 】



【 0 0 4 4 】

(R 5 および R 6 は前記と同義である。)

【 0 0 4 5 】

式 (D) で表される化合物に、式 (E) で表される化合物

【 0 0 4 6 】

【 化 1 5 】



【 0 0 4 7 】

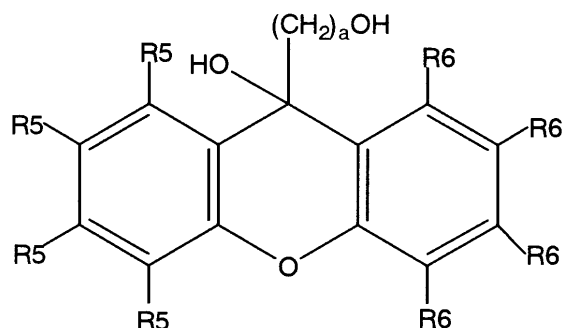
(a は 1 ~ 20 までのいずれかの整数を示し、 X は保護基を示す。)

【 0 0 4 8 】

を有機溶媒中で反応後、脱保護し、式 (F) で表される化合物を得る。なお、 X で示される保護基として、テトラヒドロピランが好ましく挙げられる。

【 0 0 4 9 】

【 化 1 6 】



(F)

10

【 0 0 5 0 】

(R 5、R 6 および a は前記と同義である。)

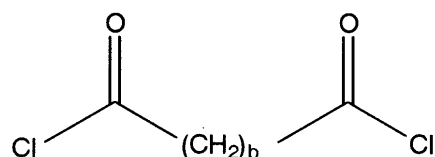
【 0 0 5 1 】

式 (F) で表される化合物に、式 (G) で表される大過剰の公知の化合物

20

【 0 0 5 2 】

【 化 1 7 】



(G)

【 0 0 5 3 】

(b は 1 ~ 4 までのいずれかの整数を示す。)

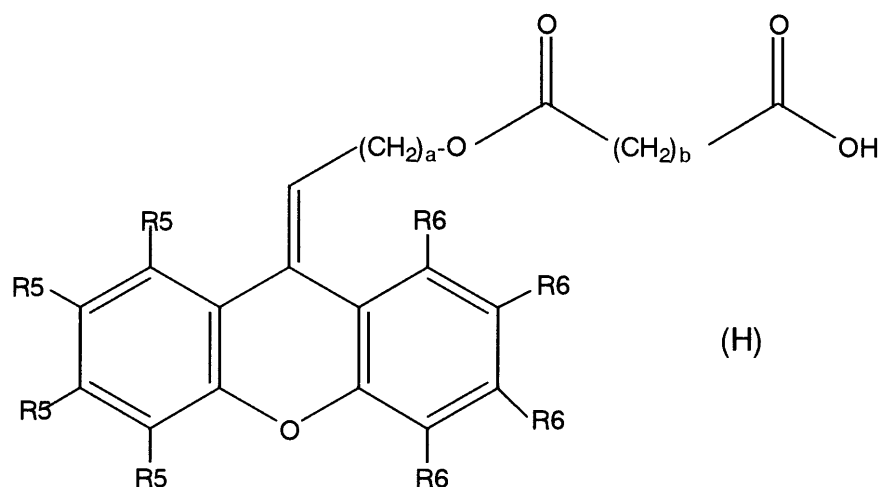
【 0 0 5 4 】

を炭酸カリウム存在下で反応させ、次いで酸クロリドを加水分解し、式 (H) で表される化合物

30

【 0 0 5 5 】

【 化 1 8 】



(H)

40

【 0 0 5 6 】

(R 5、R 6、a および b は前記と同義である。)

【 0 0 5 7 】

50

を得る。

必要に応じて、式 (H) で表される化合物の側鎖の部分に、常法に従って、高分子化合物を結合させる。

【0058】

(3) 本発明の抗体の製造方法

本発明の抗体は、抗原として本発明のハプテン抗原を用い、一般式 (4) に示す化合物に反応性を示す抗体を得ること以外は、当業者によく知られた通常の方法を採用することができる。具体的には、本発明の抗体は、例えば、下記のようにして製造することができる。

【0059】

ポリクローナル抗体を取得する場合は、前記のハプテン-キャリアタンパク質複合体を抗原として、例えば、マウスを常法にしたがって免疫する。使用するマウスの種類は特に限定されないが、一般にはBALB/c系のマウスが用いられる。マウス1匹当たり抗原50~100 μ gの割合で、フロイントの完全アジュバント若しくは不完全アジュバントと共に腹腔内若しくは皮下に、又はアジュバントを加えずに静脈内若しくは直接脾臓に免疫する。初回免疫2~3週間後に同一の方法により追加免疫を行う。

【0060】

免疫成立の確認は、マウスから採血し、公知のELISA法により血中の抗体価を測定することにより実施することができる。

【0061】

モノクローナル抗体は、通常モノクローナル抗体の作製に用いられる方法 (Kohler, G. & Milstein, C.: Nature, 256: 495-497, 1975) と同様に調製できる。具体的には、前記ポリクローナル抗体を取得する場合と同様の方法で、マウスを免疫する。使用するマウスの種類、抗原の量もポリクローナル抗体を取得する場合と同様である。

ポリクローナル抗体を取得する場合と同様に免疫成立の確認を実施することができる。なお、細胞融合の3日前に抗原を免疫動物に静脈注射することにより、抗体産生活性を有するハイブリドーマを得る確率を高くすることが可能である。

【0062】

次に前記のようにして免疫したマウスの脾細胞とミエローマ細胞とを融合させる。ミエローマ細胞としては、PAIミエローマ細胞 (Stocker, J. W., Forster, H. K., Miggiano, M., Stahl, C., Stahli, G., Takacs, B., and Staehelin, T. Generation of 2 new mouse myeloma cell lines 'PAI' and 'PAI-0' for hybridoma production. Res. Disclos., 217: 155-157, 1982.) を例示することができる。

【0063】

細胞融合及びハイブリドーマの選択方法を、例示すれば下記のとおりである。脾細胞及びミエローマ細胞を、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン培地 (以下「HAT培地」と記載する。例えば、シグマ社から購入可能。) 中で培養する。ミエローマ細胞として、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子又はチミジンキナーゼ遺伝子の変異した変異株を用い、融合処理後の細胞をこの培地で培養すると、融合しない細胞は死滅し、融合した細胞のみが増殖するので、融合細胞を選別することができる。次に、ELISA法により目的とするハプテン抗原に対する抗体を産生しているハイブリドーマの選択を下記のとおり行う。

【0064】

固相ELISA法に使用するイムノプレートに、本発明のハプテン抗原をコーティングし、ハイブリドーマ培養上清を適当に希釈して添加し、未吸着物を洗浄除去し、アルカリフォスファターゼ又はパーオキシダーゼを結合させた2次抗体を添加する。未吸着の2次抗

10

20

30

40

50

体を洗浄して除去し、発色基質としてパラニトロフェニルリン酸（カペル社製）、オルトフェニレンジアミン又は2,2-アジノ-ジ-3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸を、使用した酵素に応じて添加し、目的とする抗体を産生している細胞の培養上清を加えた穴を発色させる。このようにして目的とするハイブリドーマが得られ、公知の限界希釈法によりクローニングを行い、ハイブリドーマ・クローンを確立することができる。

【0065】

本発明のモノクローナル抗体は、上記のようにして得られたハイブリドーマの培養上清から、公知のアフィニティクロマトグラフィー、硫酸塩析などによって分離精製することができるが、同系のマウス腹腔内にハイブリドーマを接種し、腹水を生成させることにより、1000～10000倍程度に濃縮されたモノクローナル抗体を得ることもできる。

10

【0066】

本発明の抗体は、上記のようにして得ることができる。また、本発明のハプテン抗原の好ましい一形態であるコハク酸モノ6-(2,3,6,7-テトラクロロキサンテン-9-イリデン)ヘキシル複合体を免疫原として作製されたハイブリドーマDx-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（〒305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1番地1 中央第6）に、平成14年4月19日に、寄託番号FERM P-18827として寄託されているため、これを用いて本発明の抗体の好ましい一形態を得ることもできる。

【0067】

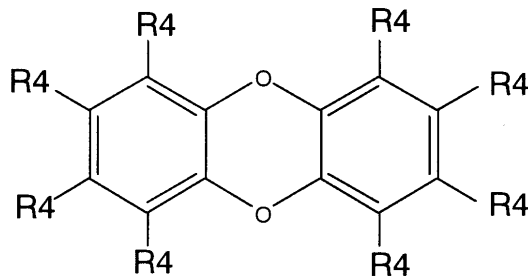
(4) 本発明の抗体

20

本発明の抗体は、一般式(4)

【0068】

【化19】



30

【0069】

(ただし、一般式(4)中、R4は水素原子、ハロゲン原子、アミノ基又はニトロ基を示す。)で表される化合物のうちの一つ又は複数と反応性を示す抗体又はそのフラグメントである。本発明の抗体は、好ましくはモノクローナル抗体である。

本発明の抗体のフラグメントとは、抗原に結合するのに十分な抗体の部分領域のことをいい、例えば、抗体のFab、F(ab')、F(ab')₂などが挙げられる。

本明細書においては、単に「抗体」というときは、「抗体又はそのフラグメント」のことを意味することがある。

【0070】

40

本発明の抗体は、公知の免疫クロマト法などにより、抗体のアイソタイプを決定することができる。

【0071】

既知のダイオキシン類の中で、2,3,7,8-テトラクロロダイオキシンがその毒性が最強であり、最も問題視されている。本発明の新規ハプテン抗原の好ましい一形態であるコハク酸モノ6-(2,3,6,7-テトラクロロキサンテン-9-イリデン)ヘキシルタンパク質複合体のハプテン部分は、2,3,7,8-テトラクロロダイオキシンのダイオキシン骨格における塩素の置換数、置換位置が、キサンテン骨格において同じであるダイオキシン類似体である。このハプテン抗原を免疫原として取得された本発明の抗体が、2,3,7,8-テトラクロロダイオキシンの2位の塩素をアミノ基又はニトロ基に置換

50

したダイオキシンを認識したことから、本抗体は2, 3, 7, 8 - テトラクロロダイオキシンを認識する可能性が高いと考えられる。

【0072】

既知のダイオキシン類 - タンパク質複合体抗原では、人体および環境に対する危険性の点で、4個以上の塩素で置換されたダイオキシン類の抗原を作製することは望ましくないと考えられるが、本発明の新規ハプテン抗原は、1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8の任意の位置に塩素を有していても毒性は報告されておらず、安全性に優れている。

【0073】

(5) 本発明の免疫化学的測定方法

本発明の免疫化学的測定方法は、本発明の抗体又はそのフラグメントを用いて免疫化学的に測定することを特徴とする、ダイオキシン類の免疫化学的測定方法である。本発明の方法は、抗原及び抗体として本発明のハプテン抗原及び本発明の抗体を用いる以外は、当業者によく知られている通常の免疫学的測定方法を適用することができる。本発明の免疫化学的測定方法の具体的な形態は、本発明のハプテン抗原を固相に固定化し、測定するダイオキシン類と本発明の抗体を添加し、固定化されたハプテン抗原に対して結合した抗体を検出することによって、前記ダイオキシン類を免疫学的に検出又は定量する方法である。本発明の免疫化学的測定方法の他の形態は、本発明のモノクローナル抗体を固相に固定化し、測定するダイオキシン類と本発明のハプテン抗原を添加し、固定化された抗体に対して結合したハプテン抗原を検出することによって、または、測定するダイオキシン類と標識物質で標識化したダイオキシン類(標識化ダイオキシン類)を添加し、固定化された抗体に対して結合した標識化ダイオキシン類を検出することによって、前記ダイオキシン類を免疫学的に検出又は定量する方法である。

10

20

【0074】

ハプテン抗原を固定化し、モノクローナル抗体との反応において、固定化ハプテン抗原とダイオキシン類とを競合させる間接競合法では、固定化されたハプテン抗原に結合したモノクローナル抗体を検出することによって、試料中のダイオキシン類を測定することができる。固定化されたハプテン抗原に結合したモノクローナル抗体の検出は、モノクローナル抗体として標識物質で標識化した標識化モノクローナル抗体を用い、この標識物質を検出することによって行うことができる。また、固相に非標識モノクローナル抗体を添加した後、さらに、このモノクローナル抗体の調製に用いた免疫動物のイムノグロブリンに対する抗体を標識物質で標識化した2次抗体を前記固相に添加し、この標識物質を検出することによっても、固定化されたハプテン抗原に結合したモノクローナル抗体を間接的に検出することができる。

30

【0075】

2次抗体は、モノクローナル抗体の調製に用いた免疫動物のイムノグロブリンに対する抗体であり、マウスモノクローナル抗体に対しては抗マウスイムノグロブリン抗体が用いられる。また、モノクローナル抗体のクラスがIgGであれば、2次抗体としては抗IgG抗体が好ましいが、抗IgG抗体を含んでいれば、他のクラスのイムノグロブリンに対する抗体を含んでいても差し支えない。

【0076】

ハプテン抗原を固定化する固相としては、アガロースビーズ、ラテックス粒子、ポリスチレン、ナイロンなどのイムノプレートが挙げられる。これらの固相にハプテン抗原を含有する試料を含む緩衝液を入れるか、又はハプテン抗原を溶解した緩衝液に固相を浸漬することによって、ハプテン抗原を固相に固定化することができる。また、ドットプロット又はウェスタンプロットによっても、ニトロセルロースフィルターやナイロンメンブレンにハプテン抗原を固定化することができる。

40

【0077】

モノクローナル抗体を標識する標識物質としては、酵素、ビオチン、ケイ光物質、発光物質、放射性同位元素などが挙げられる。酵素の検出は、酵素反応により発色する色素を基質として用いることにより行うことができる。このような酵素及び基質については後述す

50

る。ビオチンの検出は、アビジンもしくはストレプトアビジンで標識した酵素をさらにビオチンに結合させることにより、又はアビジンもしくはストレプトアビジンを介してビオチニル化した酵素を結合させることにより、酵素の検出と同様にして行うことができる。

【0078】

モノクローナル抗体を固定化し、モノクローナル抗体との反応において、ダイオキシソニン類と標識物質で標識化したダイオキシソニン類を競合させる直接競合法では、固定化されたモノクローナル抗体に結合した標識化ダイオキシソニン類を検出することによって、試料中のダイオキシソニン類を測定することができる。

モノクローナル抗体を固定化する固相としては、アガロースビーズ、ラテックス粒子、ポリスチレン、ナイロンなどのイムノプレートが挙げられる。これらの固相にモノクローナル抗体を含有する試料を含む緩衝液を入れるか、又はモノクローナル抗体を溶解した緩衝液に固相を浸漬することによって、モノクローナル抗体を固相に固定化することができる。また、ドットプロット又はウェスタンプロットによっても、ニトロセルロースフィルターやナイロンメンブレンにモノクローナル抗体を固定化することができる。

ダイオキシソニンを標識する標識物質としては、酵素、ビオチン、ケイ光物質、発光物質、放射性同位元素などが挙げられる。酵素の検出は、酵素反応により発色する色素を基質として用いることにより行うことができる。このような酵素及び基質については後述する。ビオチンの検出は、アビジンもしくはストレプトアビジンで標識した酵素をさらにビオチンに結合させることにより、又はアビジンもしくはストレプトアビジンを介してビオチニル化した酵素を結合させることにより、酵素の検出と同様にして行うことができる。

【0079】

また、モノクローナル抗体を固定化し、固定化したモノクローナル抗体との反応において、ハプテン抗原とダイオキシソニン類とを競合させる直接競合法では、固定化されたモノクローナル抗体に結合したハプテン抗原を検出し、試料中のダイオキシソニン類を測定することができる。固定化されたモノクローナル抗体に結合したハプテン抗原の検出は、ハプテン抗原として標識物質で標識化した標識化ハプテン抗原を用い、この標識物質を検出することによって行うことができる。

【0080】

モノクローナル抗体を固定化する固相としては、間接競合法に用いたものと同様のものを用いることができる。

ハプテン抗原を標識する標識物質および酵素の検出などは、間接競合法に用いたものと同様のものを用いることができる。

【0081】

本発明の方法の一形態である間接競合法によるダイオキシソニン類を測定する具体的な方法を例示する。

96穴イムノプレートの穴に、リン酸緩衝食塩水（以下、「PBS」と記載する）などのバッファで希釈したハプテン抗原を入れ、4で1晩吸着させ、のちイムノプレートをPBSを用いて洗浄する。

【0082】

この後、モノクローナル抗体などの非特異的吸着を防止するために、ブロックエース（雪印乳業社製）などのブロック溶液を各穴に添加して37で1時間又は4で1晩ブロッキングした。

【0083】

次いで、0.02% ツィーン20 PBS（PBSに0.02%の割合でツィーン20を混合した液。以下、「TPBS」と記載する。）で洗浄後、予めダイオキシソニン類を測定する試料と37で2時間反応させた前記本発明のモノクローナル抗体（一次抗体）を加え、37で45分間反応させ、プレートをTPBSで洗浄し、2次抗体としてアルカリフォスファターゼ結合抗マウス免疫グロブリン抗体、又はペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン（IgG）抗体などの標識抗マウスIgG抗体を添加し、37で45分間反応させる。前記と同様にプレートを洗浄し、発色基質を添加し、室温で15分間反応させ

10

20

30

40

50

、発色基質の極大吸収を示す波長の吸光度により酵素活性を測定する。

【0084】

アルカリフォスファターゼを用いた場合には、発色基質としてパラニトロフェニルリン酸などを、ペルオキシダーゼを用いた場合には、発色基質としてオルトフェニレンジアミン又は2,2-アジノ-ジ-3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸などを例示することができる。

【0085】

本発明のモノクローナル抗体の力価及び交差性は、ELISA法などにより、測定することができる。

【0086】

【実施例】

以下に、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は、その要旨をこえない限り、これらの実施例に限定されるものではない。

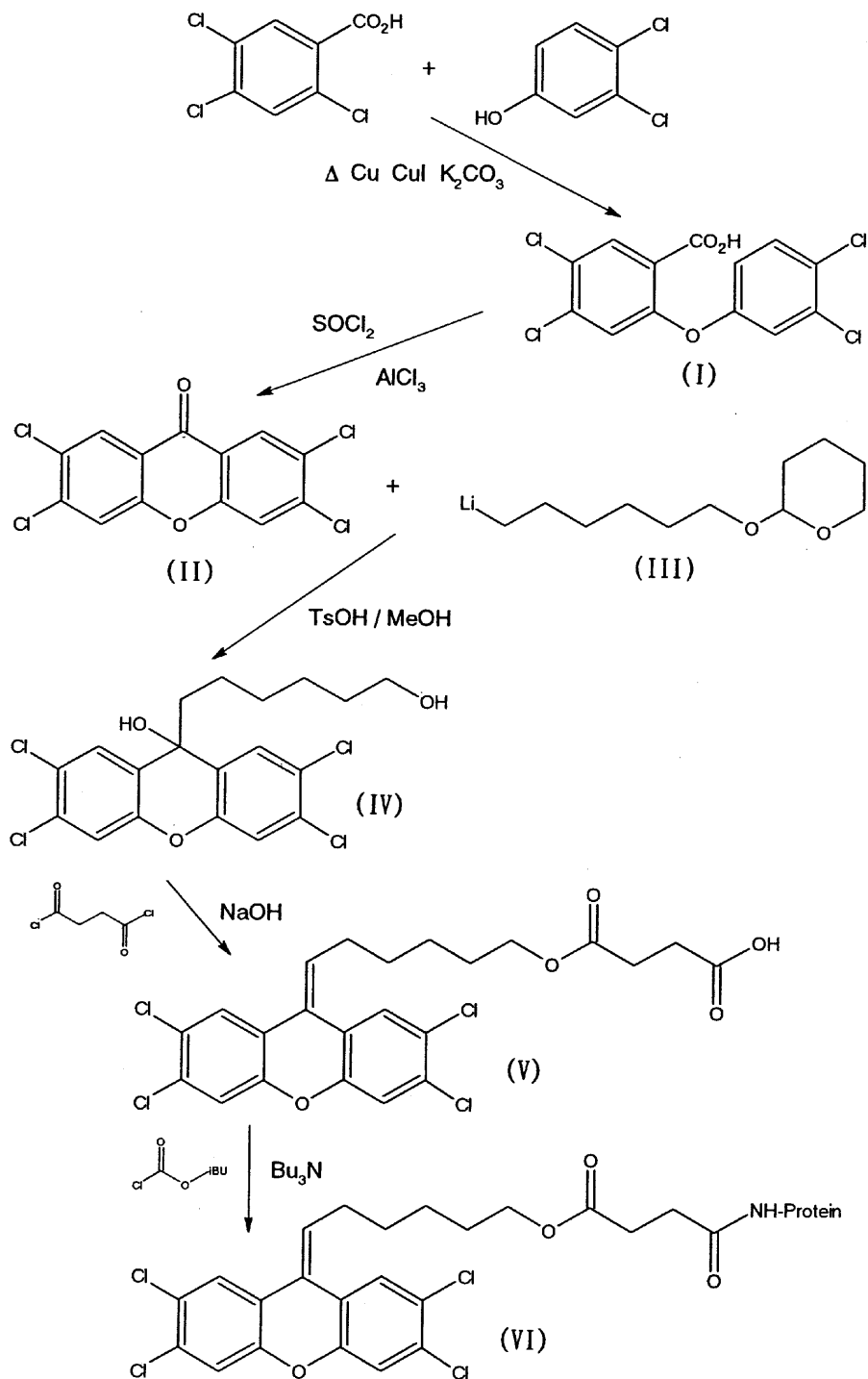
【0087】

【実施例1】新規ハプテンの合成およびキャリアータンパク質との結合

以下のようにして、コハク酸モノ6-(2,3,6,7-テトラクロロキサンテン-9-イリデン)ヘキシルタンパク質複合体を合成した。

【0088】

【化20】



10

20

30

【0089】

(i) 4,5-ジクロロ-2-(3,4-ジクロロフェノキシ)安息香酸 (I) の合成
 2,4,5-トリクロロ安息香酸 (1.48 g 6.56 mmol)、3,4-ジクロロフェノール (1.07 g 6.56 mmol)、炭酸カリウム (20 g)、銅粉 (0.4 g) および沃化銅 (0.4 g) を 100 ml のニトロベンゼンに懸濁し、アルゴン雰囲気下で 175 2.5 時間加熱した。ニトロベンゼンの大部分を減圧留去した後、水を加えて共沸により完全に留去した。残留水溶液を塩酸で酸性にした後、析出した結晶を濾取、水洗後乾燥した。このものを酢酸エチル-ヘキサンから再結晶して標題の化合物を白色結晶として得た (得量: 0.85 g)。

40

1H NMR (CDCl₃) 6.87 ppm (dd 1H) 7.08 ppm (s 1H) 7.11 ppm (d 1H) 7.44 ppm (d 1H) 8.17 ppm (s 1H)

50

【0090】

(ii) 2, 3, 6, 7 - テトラクロロ - 9 - オキソキサンテン (II) の合成
 4, 5 - ジクロロ - 2 - (3, 4 - ジクロロフェノキシ)安息香酸 (800 mg 2.2 mmol) を 20 ml の塩化チオニルに溶解し、30 分間還流した。減圧下で塩化チオニルを留去した後、残渣を塩化メチレンに溶解し、氷水浴上で塩化アルミニウム (500 mg 3.75 mmol) を攪拌しながら徐々に加えた。塩化アルミニウム添加後更に 1 時間攪拌した。反応液を塩酸溶液にあけ、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を、塩酸溶液および炭酸水素ナトリウム溶液で洗浄後、濃縮乾固し、薄褐色固体を得た (約 500 mg)。このものをクロロホルムに溶解後、ヘキサンを徐々に加え副産物である 2, 3, 7, 8 - テトラクロロ - 9 - オキソキサンテンを結晶化させ濾別除去した。濾液を濃縮乾固した後、残渣をクロロホルム - メタノールから再結晶し標題の化合物を得た (得量: 200 mg)。

10

$^1\text{H NMR (CDCl}_3)$ 7.66 ppm (s, 2H), 8.38 ppm (s, 2H)

【0091】

(iii) 6 - テトラヒドロピラニルオキシヘキシルリチウム (III) の合成
 6 - プロモヘキサノール (4 ml) と 2, 3 - ジヒドロピラン (4 ml) を混合し、室温で 30 分間攪拌した。混合物をエバポレーターで濃縮し油状物を得た。油状物 (2 g 8 mmol) をジエチルエーテルに溶解し、アルゴン雰囲気下、氷水浴上で金属リチウム (112 mg 16 mmol) に攪拌しながら徐々に添加した。氷水浴上で 2 時間攪拌後、反応液の一部をとり、キノリンを指示薬として、2 - プロパノールキシレン溶液で滴定し、6 - テトラヒドロピラニルオキシヘキシルリチウム濃度を算出した。

20

【0092】

(iv) 9 - ヒドロキシ - 9 - (6 - ヒドロキシヘキシル) - 2, 3, 6, 7 - テトラクロロキサンテン (IV) の合成

2, 3, 6, 7 - テトラクロロ - 9 - オキソキサンテン (200 mg 0.6 mmol) をテトラヒドロフランに溶解し、アルゴン雰囲気下、氷 - メタノール浴上で、攪拌しながら 6 - テトラヒドロピラニルオキシヘキシルリチウム ジエチルエーテル溶液を 1.4 当量加えた。氷 - メタノール浴上で 30 分間攪拌後、希塩酸を加え、酢酸エチルで抽出し、洗浄濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、9 - ヒドロキシ - 9 - (6 - テトラヒドロピラノキシヘキシル) - 2, 3, 6, 7 - テトラクロロキサンテンを得た (150 mg)。9 - ヒドロキシ - 9 - (6 - テトラヒドロピラノキシヘキシル) - 2, 3, 6, 7 - テトラクロロキサンテンをメタノールに溶解し、パラトルエンスルホン酸 - 水和物を耳搔き 1 杯加え、室温で 1.5 時間攪拌した。希塩酸を加え酢酸エチルで抽出し、抽出液を洗浄濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、9 - ヒドロキシ - 9 - (6 - ヒドロキシヘキシル) - 2, 3, 6, 7 - テトラクロロキサンテンを得た (得量: 70 mg)。

30

$^1\text{H NMR (CDCl}_3)$ 0.74 ppm (m, 2H), 1.15 ppm (m, 4H), 1.26 ppm (t, 2H), 1.39 ppm (m, 2H), 3.54 ppm (t, 2H), 7.25 ppm (s, 2H), 7.56 ppm (s, 2H)

40

【0093】

(v) コハク酸モノ 6 - (2, 3, 6, 7 - テトラクロロキサンテン - 9 - イリデン) ヘキシル (V) の合成

塩化メチレンに炭酸カリウム (200 mg) 及び二塩化スクシニル (1 ml) を加え、氷水浴上で攪拌しながら 9 - ヒドロキシ - 9 - (6 - ヒドロキシヘキシル) - 2, 3, 6, 7 - テトラクロロキサンテン (70 mg) 塩化メチレン溶液を徐々に滴下した。氷水浴上で 15 分間攪拌し、引き続き室温で 30 分間攪拌した。水およびテトラヒドロフランを加え、更に水酸化ナトリウム溶液を加え室温で 15 分間攪拌した。塩酸にて酸性とし酢酸エチルで抽出し、乾燥後濃縮乾固した。残渣を薄層クロマトグラフィー (ヘキサン - 酢酸エチル) にて精製して標記の化合物を白色結晶として得た (得量: 30 mg)。

50

^1H NMR (CDCl₃) 1 - 2 ppm (m 6 H), 2.49 ppm (q 2 H), 4.01 ppm (m 4 H), 4.12 ppm (t 2 H), 5.92 ppm (t 1 H), 7.20 ppm (s 1 H), 7.25 ppm (s 1 H), 7.55 ppm (s 1 H), 7.56 ppm (s 1 H)

【0094】

(vi) コハク酸モノ6-(2, 3, 6, 7-テトラクロロキサンテン-9-イリデン)ヘキシルタンパク質複合体(VI)の合成

コハク酸モノ6-(2, 3, 6, 7-テトラクロロキサンテン-9-イリデン)ヘキシル(10 mg 0.02 mmol)をアルゴン雰囲気下でジメチルホルムアミド(5 ml)に溶解し、トリブチルアミン(10 μ l)およびクロロギ酸イソブチル(4 μ l)を加え室温で20分間攪拌し、A液を調製した。 10

ウシ血清アルブミン(70 mg)を水3 mlに溶解し、0.1 N水酸化ナトリウム溶液でpHを9.0に調整し、水を加えて6 mlとし、更にジメチルホルムアミド6 mlを加え、B液を調製した。

B液を氷水浴上で攪拌し、pHが8.0~9.0となる様0.1 N水酸化ナトリウム溶液で調整しながら、A液を徐々に滴下した。滴下後、更に3時間氷水浴上で攪拌した。A+B混合液を、水に一晩透析後、凍結乾燥を行い白色粉末(70 mg)を得た。常法に従い、ウシ血清アルブミンのアミノ基を定量したところ、ウシ血清アルブミン1分子当たり、コハク酸モノ6-(2, 3, 6, 7-テトラクロロキサンテン-9-イリデン)ヘキシルが25.3分子結合していた。 20

ウシガンマグロブリンについても同様に実施した。ウシガンマグロブリン1分子当たり、コハク酸モノ6-(2, 3, 6, 7-テトラクロロキサンテン-9-イリデン)ヘキシルが5.4分子結合していた。

【0095】

【実施例2】新規ハプテン-キャリアタンパク質複合体を抗原としたモノクローナル抗体の作製

新規ハプテン-ウシ血清アルブミン複合体を免疫抗原として、常法に従いハイブリドーマ細胞を作製し、モノクローナル抗体を得た。

具体的には、コハク酸モノ6-(2, 3, 6, 7-テトラクロロキサンテン-9-イリデン)ヘキシル-ウシ血清アルブミン複合体抗原100 μ gを等量のフロイントの完全アジュバントと混合して6週齢メスBALB/cマウス5匹の腹腔内に投与した。さらに3週後に同量の抗原を等量のフロイント不完全アジュバントと混合して同様に腹腔内に投与、1週後に後眼窩静脈より採血して血清を分離し、抗体価の上昇をコハク酸モノ6-(2, 3, 6, 7-テトラクロロキサンテン-9-イリデン)ヘキシル-ウシガンマグロブリン複合体抗原を用いたELISA法にて確認した。抗体価の上昇したマウスに対して100 μ gの抗原を尾静脈内投与し、3日後に脾臓を摘出した。単離した脾臓細胞とPAIミエローマ細胞をPEG法にて5:1で細胞融合し、ハイブリドーマ細胞をHAT選択にて得た。さらに抗体産生陽性細胞をELISA法にて選択した。増殖の後、サブクローニングを行い腹腔内投与して腹水を採取した。腹水から硫酸塩析およびプロテインGアフィニティカラムにて抗体の精製を行った。SDS-PAGEで純度を確認すると共に抗体のアイソタイプを免疫クロマト法で決定した。 30 40

結果として、IgG1クラスの抗体Dx- および5B-1が得られた。

【0096】

【実施例3】抗体の力価および既知ダイオキシハプテン抗原との反応性 1) 力価
モノクローナル抗体力価の測定

コハク酸モノ6-(2, 3, 6, 7-テトラクロロキサンテン-9-イリデン)ヘキシル-ウシガンマグロブリン複合体を10 μ g/mlとなるようPBSに溶解した液を、96穴イムプレートに1穴当たり100 μ lずつ分注し、冷蔵庫中で一晩インキュベートした。1穴当たり約300 μ lのPBSで3回洗浄後、25%ブロッカーを1穴当たり250 μ l分注し、37°Cで1時間又は冷蔵庫で一晩インキュベートした(抗原固定プレ 50

ート)。直ぐに使用しない場合は、冷蔵庫中で保管した。

抗原固定プレートを0.02%ツイーン20PBS(TPBS)で3回洗浄後、TPBSで種々の濃度に希釈したモノクローナル抗体を50 μ lずつ分注し、37 $^{\circ}$ Cで45分インキュベートした。TPBSで3回洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG抗体を100 μ lずつ分注し、37 $^{\circ}$ Cで45分インキュベートした。TPBSで3回洗浄後、アルカリフォスファターゼの発色基質であるパラニトロフェニルリン酸溶液を100 μ lずつ分注し、室温で15分間反応させ、波長405nmでの吸光度をプレートリーダーにて測定した。

結果を図1に示す。2種類のモノクローナル抗体(Dx- , 5B-1)は、共に発色下限濃度は約15ng/mlで、50%発色濃度は約120ng/mlであった。

10

【0097】

2) 既知ダイオキシンハプテン抗原との反応性

Toxicology and Applied Pharmacology 82巻256-263頁(1986年)に従い合成した2-アジパミド-3,7,8-トリクロロジベンゾパラダイオキシン-ウシガンマグロブリン複合体を検出用抗原としてモノクローナル抗体力価の測定方法と同様の方法で実施した。

結果を図2に示す。Dx-aモノクローナル抗体が既知ダイオキシンハプテンと交差反応を示した。発色下限濃度は約0.5 μ g/mlで、50%発色濃度は約60 μ g/mlであった。

20

【0098】

【実施例4】間接競合法によるダイオキシン類との交差性の確認

Toxicology and Applied Pharmacology 82巻256-263頁(1986年)に従い合成した2-アミノ-3,7,8-トリクロロジベンゾパラダイオキシン(Dx-NH₂)及び2-ニトロ-3,7,8-トリクロロジベンゾパラダイオキシン(Dx-NO₂)をジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、PBSにて200倍希釈した液を原液とし、0.5%DMSO-PBSにて種々の濃度に希釈した。ダイオキシン希釈液とモノクローナル抗体(Dx-)0.25 μ g/ml溶液を等量混合し、37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。

【0099】

前記モノクローナル抗体力価の測定の項で作製した抗原固定プレートをTPBSで3回洗浄後、ダイオキシン-モノクローナル抗体混合液を100 μ lずつ分注し、37 $^{\circ}$ Cで45分インキュベートした。TPBSで3回洗浄し、アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG抗体を100 μ lずつ分注し、37 $^{\circ}$ Cで45分インキュベートした。TPBSで3回洗浄後、アルカリフォスファターゼの発色基質であるパラニトロフェニルリン酸溶液を100 μ lずつ分注し、室温で15分間反応させ、波長405nmでの吸光度をプレートリーダーにて測定した。

30

結果を図3に示す。モノクローナル抗体Dx- は、Dx-NH₂及びDx-NO₂と交差反応性を示した。50%競合濃度は、Dx-NH₂で約4 μ g/ml、Dx-NO₂で約12 μ g/mlであった。

40

【0100】

【発明の効果】

本発明により、安全性に優れ、かつ、種々の塩素化ダイオキシン類について識別性の優れた抗体を取得するためのダイオキシン類のハプテン抗原が提供される。

【0101】

【図面の簡単な説明】

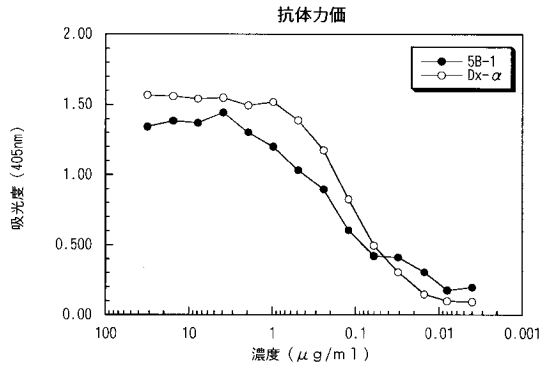
【図1】図1は、モノクローナル抗体の力価を示す図である。

【図2】図2は、モノクローナル抗体の既知ダイオキシンハプテンとの交差反応性を示す図である。

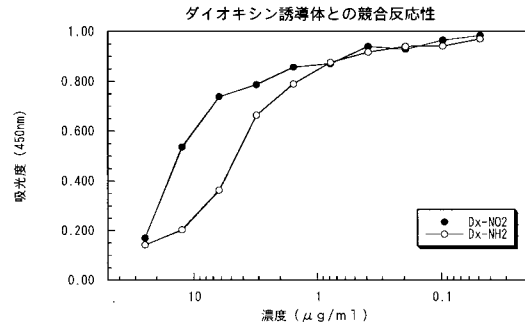
【図3】図3は、モノクローナル抗体のダイオキシン誘導体との競合反応性を示す図である。

50

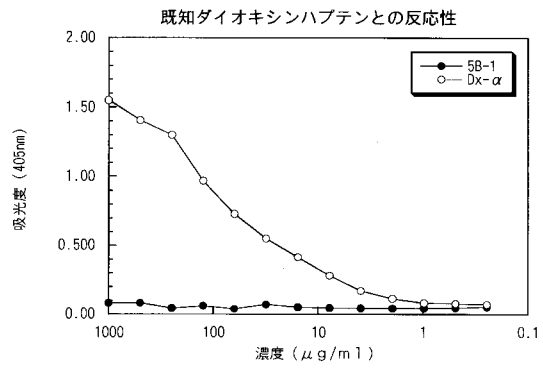
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/531	C 1 2 N 15/00	C
G 0 1 N 33/577	C 1 2 N 5/00	B
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 水島 裕

東京都世田谷区梅丘一丁目1番11号

(72)発明者 浅野 聡子

神奈川県横浜市青葉区すすき野三丁目6番19-103号

(72)発明者 濱野 弘一

神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社生物科学研究所内

(72)発明者 原田 義次

神奈川県座間市東原五丁目1番83号 森永乳業株式会社生物科学研究所内

Fターム(参考) 4B024 AA11 DA02 GA03 HA15

4B064 AG27 AG31 CA10 CA20 CC24 CE04 CE12

4B065 AA91X AA91Y AB05 BA01 BA08 CA25 CA46

4C062 HH17

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA51 DA76 DA86 EA50 GA06 GA26

【要約の続き】

【選択図】 図3

专利名称(译)	新型半抗原抗原，单克隆抗体和使用其检测二恶英的方法		
公开(公告)号	JP2004026704A	公开(公告)日	2004-01-29
申请号	JP2002184307	申请日	2002-06-25
[标]申请(专利权)人(译)	日本株式会社LTT生物医药 森永乳业株式会社		
申请(专利权)人(译)	LTT有限公司生物制药 森永乳业株式会社		
[标]发明人	檜垣惠 水島裕 浅野聡子 濱野弘一 原田義次		
发明人	檜垣 惠 水島 裕 浅野 聡子 濱野 弘一 原田 義次		
IPC分类号	G01N33/53 C07D311/82 C07K14/00 C07K16/44 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/531 G01N33/577		
FI分类号	C07D311/82 C07K14/00 C07K16/44 G01N33/53.S G01N33/531.A G01N33/577.B C12N15/00.C C12N5/00.B C12P21/08 C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/DA02 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE04 4B064/CE12 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AB05 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4C062/HH17 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA51 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/GA06 4H045/GA26		
代理人(译)	远山 勉 川口义行		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供二恶英的半抗原，以获得安全性优异，与各种氯化二恶英的区分性优异的抗体。 解决方案：下列通式(1) [化学1] (然而，在通式(1)中，n表示1至20的任何整数，R1独立地表示氢原子，卤素原子，氨基，硝基或甲基，并且R2表示羟基，由羧酰氧基，羧基，氨基或硫醇表示的化合物。 [选择图]图3

