

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)			
C 0 7 F 9/165		C 0 7 F 9/165	L	4	B 0 2 4	
	9/24		G	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 33/53	G	4	H 0 5 0	
審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 17数) 最終頁に続く						

(21)出願番号	特願2000 - 49448(P2000 - 49448)	(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
(22)出願日	平成12年2月25日 (2000.2.25)	(72)発明者	森宗 孝介 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	金子 隆司 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】 エチルチオメトンのハプテン化合物、抗体及び測定方法

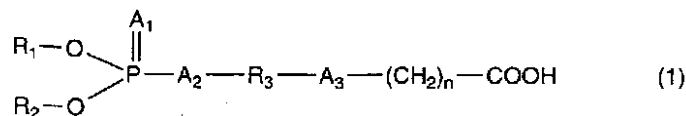
(57)【要約】

【課題】 本発明は、エチルチオメトン類縁化合物のハプテン化合物、抗体及び測定方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 本発明のハプテン化合物は、エチルチオメトン類縁化合物又はその部分にスパーサーアーム及び結合のための官能基を共有結合させた構造を有する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】以下の式 (1) :

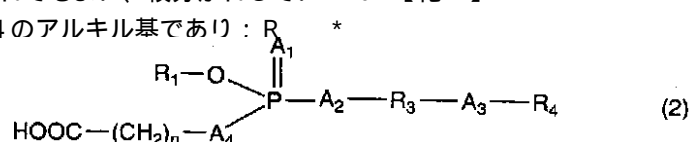


[式 (1) 中、

A_1 は、S 又は O であり； A_2 は、S、O 又は NH であり； A_3 は、S、S = O 又は O = S = O であり； R_1 及び R_2 は、各々独立に選択されてもよい、枝分かれしていてもよい炭素数 1 ないし 4 のアルキル基であり；

A_3 は、枝分かれしていてもよい炭素数 1 ないし 4 のアルキレン基であり；そして n は 1 - 10 の整数である。]

【化 2】



[式 (2) 中、

A_1 は、S 又は O であり； A_2 は、S、O 又は NH であり； A_3 は、S、S = O 又は O = S = O であり； A_4 は、O 又は NH であり； R_1 及び R_4 は、各々独立に選択されてもよい、枝分かれしていてもよい炭素数 1 ないし 4 のアルキル基であり； R_3 は、枝分かれしていてもよい炭素数 1 ないし 4 のアルキレン基であり；そして m は 1 - 10 の整数である。]

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 (3) 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 8】請求項 6 に記載の結合体を抗原として用いることにより製造された、式 (3) 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 9】モノクローナル抗体である、請求項 8 に記載の抗体又はフラグメント。

【請求項 10】寄託番号 FERM P - 17732 で寄託されているハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体 44K7 - 1 - 1 である、請求項 8 若しくは 9 に記載の抗体又はフラグメント。

【請求項 11】請求項 8 ないし 10 のいずれか 1 項に記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 12】寄託番号 FERM P - 17732 で寄託されている、請求項 11 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 13】請求項 8 ないし 10 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 (3) で表される化合物の免疫化学的測定方法。

【請求項 14】さらに請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の化合物、又は請求項 6 に記載の結合体を用いることを含む、請求項 13 に記載の免疫化学的測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

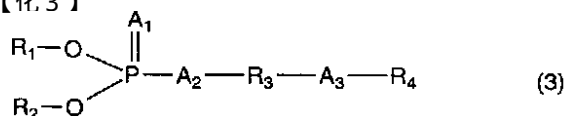
【発明の属する技術分野】本発明は、O, O - ジエチル - S - 2 - (エチルチオ)エチルホスホロジチオエート (一般には、「エチルチオメトン」又は「ジスルホトン」と呼称される：以下、本明細書中「エチルチオメトン」と言う) 及びその類縁化合物のハプテン化合物、抗原、抗体及びそのフラグメントに関する。

【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】エチルチオメトンは、以下の式 (4) :

【化 3】

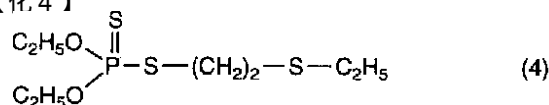


[式 (3) 中、

A_1 は、S 又は O であり； A_2 は、S、O 又は NH であり； A_3 は、S、S = O 又は O = S = O であり； R_1 、 R_2 及び R_4 は、各々独立に選択されてもよい、枝分かれしていてもよい炭素数 1 ないし 4 のアルキル基であり；そして R_3 は、枝分かれしていてもよい炭素数 1 ないし 4

【0004】

【化4】



【0005】で表される構造を有する、有機リン系化合物である。エチルチオメトン、浸透性有機リン殺虫剤で、野菜、イネなどの害虫防除に用いられる。具体的には、アブラムシ類、ハダニ類などの吸収性害虫に効果があり、土壌処理により植物体の根から吸収させ、発芽後の作物害虫による加害を防止する。残効が長く、6ないし8週間持続するといわれる。ダイコン、ハクサイなどの生育中にトップドレッシングしても効果がある。また、イネの場合、田植え前の育苗箱の苗に施用することにより、本田初期のウンカ・ヨコバイ類を防除できるが、ツマグロヨコバイの一部の個体群は抵抗性を生じているので注意する（農薬ハンドブック 第2頁 - 第3頁、第37頁 - 第38頁及び第604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。エチルチオメトンについては、農薬登録保留基準が、米で0.07ppm、果実で0.05ppm、野菜で0.1ppm、いも類で0.1ppm、豆類で0.05ppm等と定められている（最新 農薬の規制・基準値便覧、1995年版、第104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、エチルチオメトン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、例えば農作物中のエチルチオメトンは米、果実、野菜、いも類、豆類等から抽出し、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、ジクロロメタンに転用し、ヘキサン・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、そしてジクロロメタン、アセトンに転溶後、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234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。エチルチオメトン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、エチルチオメトン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】エチルチオメトンについては、その必要性が非常に高かったにもかかわらず、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、エチルチオメトン及びその類縁化合物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、エチルチオメトンに反応性を有するモノクローナル抗体を提供する。本発明は、また、エチルチオメトン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（エチルチオメトンハプテン）を提供することを目的とする。

【0015】本発明は、さらに、エチルチオメトン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。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マを提供することを目的とする。

【0016】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／又は前記エチルチオメトン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、エチルチオメトンの免疫化学的測定方法を提供することを目的とする。

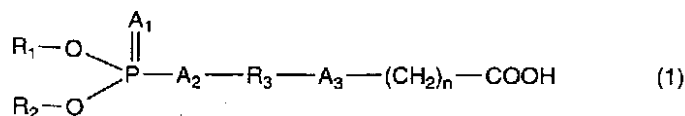
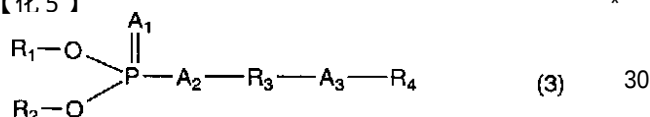
【0017】

【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、エチルチオメトン又はその部分にスパ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、エチルチオメトン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。

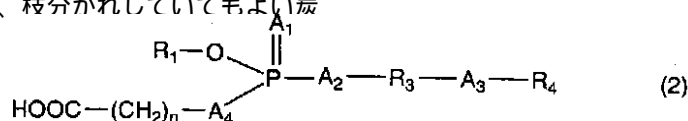
【0018】本発明の対象となるエチルチオメトン類縁化合物は、以下の式(3)：

【0019】

【化5】



【0026】[式(1)中、 A_1 は、S又はOであり； A_2 は、S、O又はNHであり； A_3 は、S、S=O又はO=S=Oであり； R_1 及び R_2 は、各々独立に選択されてもよい、枝分かれしていてもよい炭素数1ないし4のアルキル基であり； R_3 は、枝分かれしていてもよい炭



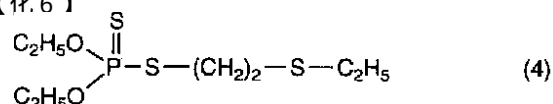
【0028】[式(2)中、 A_1 は、S又はOであり； A_2 は、S、O又はNHであり； A_3 は、S、S=O又はO=S=Oであり； A_4 は、O又はNHであり； R_1 及び R_4 は、各々独立に選択されてもよい、枝分かれしていてもよい炭素数1ないし4のアルキル基であり； R_3 は、枝分かれしていてもよい炭素数1ないし4のアルキレン基であり；そしてnは1 - 10の整数である。]

*【0020】[式(3)中、 A_1 は、S又はOであり； A_2 は、S、O又はNHであり； A_3 は、S、S=O又はO=S=Oであり； R_1 、 R_2 及び R_4 は、各々独立に選択されてもよい、枝分かれしていてもよい炭素数1ないし4のアルキル基であり；そして R_3 は、枝分かれしていてもよい炭素数1ないし4のアルキレン基である。]

【0021】特に好ましい対象化合物であるエチルチオメトンは、以下の式(4)：

【0022】

【化6】



【0023】で表される構造を有する化合物である。本明細書において、「エチルチオメトン」は、文脈により式(4)で表されるエチルチオメトン及び／または式(3)で表されるエチルチオメトン類縁化合物を意味する。

【0024】本発明の抗体は、例えば、エチルチオメトン類縁化合物の一部分にスパ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)：

【0025】

【化7】

素数1ないし4のアルキレン基であり；そしてnは1 - 10の整数である。]

【0027】

【化8】

【0029】式(1)中、好ましくは、 A_1 及び A_3 がS

【0029】式(1)中、好ましくは、 A_1 及び A_3 がS

であり、 A_2 がNHであり、 R_1 及び R_2 がエチル基であり、そして R_3 がエチレン基である。好ましくは、 n は5である。

【0030】式(2)中、好ましくは、 A_1 及び A_3 がSであり、 A_2 及び A_4 がNHであり、 R_1 及び R_4 がエチル基であり、そして R_3 がエチレン基である。好ましくは、 m は3である。

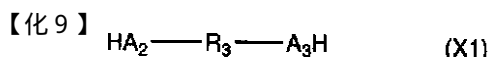
【0031】本発明は、前記ハプテン化合物、ハプテン化合物と高分子化合物との結合体、エチルチオメトンに反応する抗体及びその作製方法、並びに該ハプテン化合物又は該抗体を用いるエチルチオメトンの免疫化学的測定方法に関する。

【0032】エチルチオメトンハプテンの作製
式(1)又は(2)で表されるエチルチオメトンハプテンは、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。

【0033】I) 式(1)のエチルチオメトンハプテンの一般的製造方法

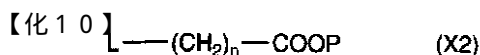
まず、以下の式(X1)：

【0034】



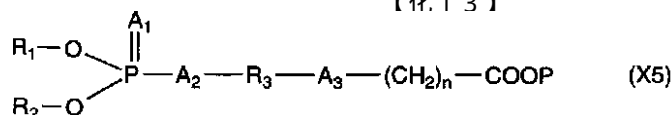
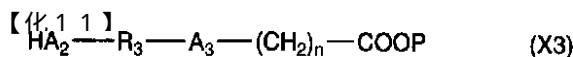
【0035】[式(X1)中、 A_2 、 A_3 及び R_3 は先に定義した通りである]の構造を有する化合物を有機溶媒中、塩基の存在下、以下の式(X2)：

【0036】



【0037】[式(X2)中、Pは、カルボキシル基の保護基であり；Lは、F、Cl、Br及びIから選択されるハロゲン原子であり；そして、 n は、先に定義した通りである]で表される構造を有する化合物と反応させて、以下の式(X3)：

【0038】



【0045】[式(X5)中、 A_1 、 A_2 、 A_3 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、P及び n は先に定義した通りである]で表される構造を有する化合物を得る。

【0046】式(X5)の化合物の合成のための有機溶媒としては、例えば、アセトニトリル、アセトン、ヘキササン、ペンタン、ベンゼン、トルエン、ジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、酢酸エチル、ジグリム、N,N-ジメチルホルムアミド、ヘキサメチルリン酸トリアミド等、又はこれらの混合溶媒を用

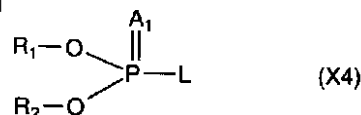
【0039】[式(X3)中、 A_2 、 A_3 、 R_3 、P及び n は先に定義した通りである]で表される構造を有するエステル化合物を得る。式(X3)の化合物の合成のための有機溶媒としては、例えば、エタノール、メタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、テトラヒドロフラン等が挙げられる。塩基としては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸リチウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素ナトリウム、ナトリウムメチラート、ナトリウムエチラート、トリエチルアミン、N,N-ジメチルアニリン、リチウムジイソプロピルアミド等を用いることができる。

【0040】反応は、マイナス10 から溶媒の沸点、好ましくは20 から80 で、30分から10時間、好ましくは30分から2時間行う。Pで表される示されるカルボキシル基の保護基は公知のものでよく、具体例として、例えばメチル基、エチル基、tert-ブチル基、ベンジル基、p-メトキシベンジル基、3,4-ジメトキシベンジル基、トリクロロエチル基、トリメチルシリル基、tert-ブチルジメチルシリル基、tert-ブチルジフェニルシリル基、トリエチルシリル基、トリイソプロピルシリル基、トリメチルシリルエトキシメチル基等が挙げられる。

【0041】次いで、式(X3)の化合物を、以下の式(X4)：

【0042】

【化12】



【0043】[式(X4)中、 A_1 、 R_1 、 R_2 及びLは先に定義した通りである]で表される構造を有するハロゲン化リン酸エステルと、有機溶媒中、塩基の存在下で反応させて、以下の式(X5)：

【0044】

【化13】

いることができる。塩基としては、例えば、前述した式(3)の化合物の合成に使用可能なものと同様のものを使用できる。

【0047】反応は、マイナス10 から溶媒の沸点、好ましくは20 から80 で、30分から5時間、好ましくは30分から2時間行う。さらに、式(X5)の化合物からPで表されるカルボキシル基の保護基を除去することにより、式(1)の化合物を得ることができる。カルボキシル基の保護基の除去は、酸加水分解、ア

ルカリ加水分解等の公知の方法で行うことができる。

【0048】すなわち、酸加水分解の場合は、式(X5)の化合物を、好ましくは酢酸、蟻酸、ベンゼン、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン等の有機溶媒に溶解し、次いで塩酸、硫酸、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体、トリフルオロ酢酸、トリフルオロメタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等を加えて、0 から溶媒の沸点の温度、好ましくは0 から50 で、5分から10時間、好ましくは1時間から5時間撹拌反応させることにより式(1)の化合物を得ることができ 10

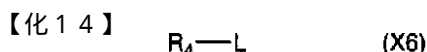
【0049】また、アルカリ加水分解の場合は、式(X5)の化合物を、好ましくはメタノール、エタノール、テトラヒドロフラン、エチレングリコール等の有機溶媒に溶解し、次いで炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、水酸化リチウム、水酸化ナトリウム又は水酸化カリウム等の水溶液を加えて、0 から溶媒の沸点の温度、好ましくは0 から室温で、5分から10時間、好ましくは1時間から2時間撹拌反応させることにより式(1)の化合物を得ることができ 20

【0050】さらに、Pがベンジル基の場合、脱保護は水素による加水素分解によっても行うことができる。さらにまた、Pがシリル原子を含む基の場合、脱保護はテトラ-n-ブチルアンモニウムフルオリド、ピリジニウムフルオリド等のフッ素アニオンを発生させる試薬によっても行うことができる。

【0051】II) 式(2)のエチルチオメトンハプテンの一般的製造方法

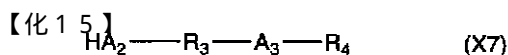
まず、上述の式(X1)の化合物に、以下の式(X6)：

【0052】

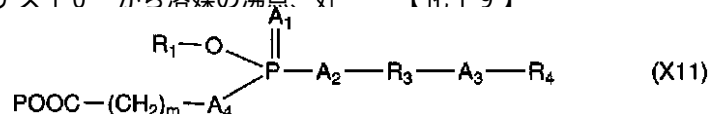


【0053】[式(X6)中、 R_4 及びLは先に定義した通りである]で表される構造を有する化合物を有機溶媒中、塩基の存在下、反応させて、以下の式(X7)：

【0054】



【0055】[式(X7)中、 A_2 、 A_3 、 R_3 及び R_4 は 40 先に定義した通りである]で表される構造を有する化合物を得る。反応は、マイナス10 から溶媒の沸点、好



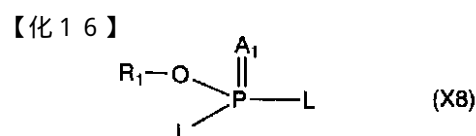
【0066】[式(X11)中、 A_1 、 A_2 、 A_3 、 A_4 、 R_1 、 R_3 、 R_4 、P及びmは先に定義した通りである]で表される構造を有する化合物を得る。

【0067】反応は、マイナス10 から溶媒の沸点、 50

ましくは20 から80 で、30分から10時間、好ましくは30分から2時間行う。式(X7)の化合物の合成のための有機溶媒及び塩基としては、前述した式(X3)の化合物の合成に使用可能な有機溶媒及び塩基と同様のものを使用可能である。

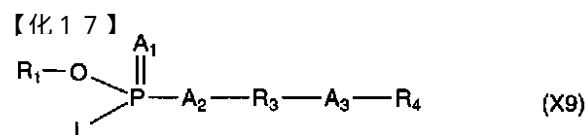
【0056】次いで、式(X7)の化合物に、以下の式(X8)：

【0057】



【0058】[式(X8)中、 A_1 、 R_1 及びLは先に定義した通りである]で表される構造を有するハロゲン化リン酸エステルと、有機溶媒中、塩基の存在下で反応させて、以下の式(X9)：

【0059】

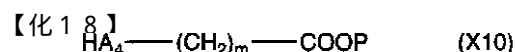


【0060】[式(X9)中、 A_1 、 A_2 、 A_3 、 R_1 、 R_3 、 R_4 及びLは先に定義した通りである]で表される構造を有する化合物を得る。

【0061】反応は、マイナス10 から溶媒の沸点、好ましくは0 から30 で、30分から30時間、好ましくは30分から24時間行う。式(X9)の化合物の合成のための有機溶媒及び塩基としては、前述した式(X5)の化合物の合成に使用可能な有機溶媒及び塩基と同様のものを使用可能である。

【0062】次いで、式(X9)の化合物に、以下の式(X10)：

【0063】



【0064】[式(X10)中、 A_4 、P及びmは先に定義した通りである]で表される構造を有する化合物を反応させて、以下の式(X11)：

【0065】

【化19】

好ましくは30 から80 で、30分から24時間、好ましくは30分から2時間行う。式(X11)の化合物の合成のための有機溶媒及び塩基としては、前述した式(X5)の化合物の合成に使用可能な有機溶媒及び塩

基と同様のものを使用可能である。

【0068】さらに、式(11)の化合物からPで表されるカルボキシル基の保護基を除去することにより、式(2)の化合物を得ることができる。カルボキシル基の保護基の除去は、式(1)の化合物の合成に関して前述した酸加水分解、アルカリ加水分解等の公知の方法で行うことができる。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。

【0069】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。

【0070】エチルチオメトン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エチルチオメトン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。

【0071】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。

【0072】エチルチオメトンハブテンと高分子化合物との結合は、例えば、活性化エステル法(A. E. KARU et al.: J. Agric. Food Chem. 42 301-309(1994))、又は混合酸無水物法(B. F. Erlanger et al.: J. Biol. Chem. 234 1090-1094(1954))等の公知の方法によって行うことができる。

【0073】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、ハブ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。

【0074】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。反応に使用するハブテン化合物と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。

【0075】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、当該アミノ基とハブ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、エチルチオメトンハブテンと高分子化合物との結合体を得ることができる。

【0076】一方、混合酸無水物法において用いられる酸無水物は、通常のショットン-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。ショットン-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、ショットン-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ゲン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ゲン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。

【0077】また、上記と同様の方法により、酵素等の標識物質をエチルチオメトンハブ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、 ^{32}P 、 ^{125}I 等の放射性物質、化学発光物質などがある。

【0078】ポリクローナル抗体の作製

エチルチオメトン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、エチルチオメトンハプテンと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。

【0079】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。

【0080】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、エチルチオメトン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。本発明においてエチルチオメトンハプテンと高分子化合物との結合体を免疫用抗原として得られた抗血清は、後述する間接競合ELISA法において、エチルチオメトンの量を $0.01\mu\text{g}/\text{ml}$ ないし $100\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で測定することができる（実施例5、図1）。

【0081】モノクローナル抗体の作製

エチルチオメトン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。

【0082】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エチルチオメトン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 テクニック

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。

【0083】以下、本発明のエチルチオメトン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。

(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。

【0084】(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。

【0085】(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マウス由来骨髓腫細胞株の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-Ag 4-1(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等の骨髓腫細胞株、あるいはラット由来の210.RCY3-Ag 1.2.3.(Y3)(Nature, 277, 131-133, (1979))等を使用できる。

【0086】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。

【0087】(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。

【0088】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。

【0089】(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、エチルチオメトンに対する抗体活性を測定する。

【0090】さらに、測定によりエチルチオメトン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。

【0091】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、抗エチルチオメトン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。

【0092】(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。

【0093】これらにより得られた培養上清液あるいは腹水液を抗エチルチオメトン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エチルチオメトン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。

【0094】以上のようにして得られた抗エチルチオメトン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。

【0095】抗体によるエチルチオメトンの測定

本発明で使用する抗体によるエチルチオメトンの測定法としては、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、ブランク法、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。

【0096】エチルチオメトンの測定は、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。

(a) まず、固相化用抗原であるエチルチオメトン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。

【0097】(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。

(c) これに各種濃度のエチルチオメトン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エチルチオメトンに競合的に反応させて、固相化抗原-抗体複合体及び、エチルチオメトン-抗体複合体を生成させる。

【0098】(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エチルチオメトンの量を決定することができる。(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。

【0099】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 µg/mlから100 µg/ml程度、好ましくは0.05 µg/mlから5 µg/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 µl/ウェル以下で20 µl/ウェルから150 µl/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。

【0100】なお、担体に固相化させる抗原としては、抗体を作製したエチルチオメトン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)または(2)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)又は(2)において $A_1 - A_4$ 、 $R_1 - R_4$ 、 m 又は n のいずれか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)又は(2)に含まれない他のエチルチオメトン類縁化合物を固相化抗原として使用することも可能である。

【0101】(b)工程のブロッキングは、抗原(エチルチオメトン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、エチルチオメトン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。

【0102】次いで(c)工程において、エチルチオメトン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エチルチオメトンと反応させることにより、固相化抗原-抗体複合体及びエチルチオメトン-抗体複合体が生成する。

【0103】この際、抗体としては、第一抗体として本願発明のエチルチオメトン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。

【0104】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。

【0105】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。

【0106】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エチルチオメトンの量を算出することができる。

【0107】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、450nmの吸光度を測定する。OPDを使用する場合、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。

【0108】エチルチオメトン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。既知の濃度のエチルチオメトン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、試料中のエチルチオメトンの濃度を算出できる。

【0109】あるいはエチルチオメトンの測定は、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。

(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。

【0110】(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。

(c)上記工程とは別に、各種濃度のエチルチオメトンを含む試料に、エチルチオメトン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。

【0111】(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エチルチオメトンの量を決定する。

【0112】(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。

【0113】(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エチルチオメトン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E L I S A法と同様のものを使用できる。

【0114】(c)工程において用いる酵素結合ハプテンの調製は、エチルチオメトン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10
【0115】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E L I S A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エチルチオメトンハプテン自体のみならず、式(1)又は(2)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)又は(2)において $A_1 - A_4$ 、 $R_1 - R_4$ 、 m 又は n のいずれかが抗体作製用と相違する化合物を、標識用抗原と20
して使用することもできる。さらに、式(1)又は(2)に含まれない他のエチルチオメトン類縁化合物も、標識用抗原として使用可能である。

【0116】(d)工程においてエチルチオメトン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、エチルチオメトン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。エチルチオメトン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30
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P B Sを使用すること

ができる。

【0117】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E L I S A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エチルチオメトンの量を算出することができる。

【0118】本発明のモノクローナル抗体44K7-1-1は、直接競合E L I S A法において約 0.2 ng/ml から約 50 ng/ml 、好ましくは約 0.2 ng/ml から約 6 ng/ml の濃度範囲でエチルチオメトンと反応する(実施例7、図2)。

【0119】さらに、前述したように直接競合E L I S A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E L I S A法において固有の反応性を示す。

【0120】本発明の抗体の交差反応性

上述した直接競合E L I S A法又は間接競合E L I S A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。

【0121】例えば、モノクローナル抗体44K7-1-1は、エチルチオメトンの類縁化合物にほとんど反応性を示さず、エチルチオメトンに対して非常に高い特異性を有する(実施例8、表7)。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限定するためのものではない。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。

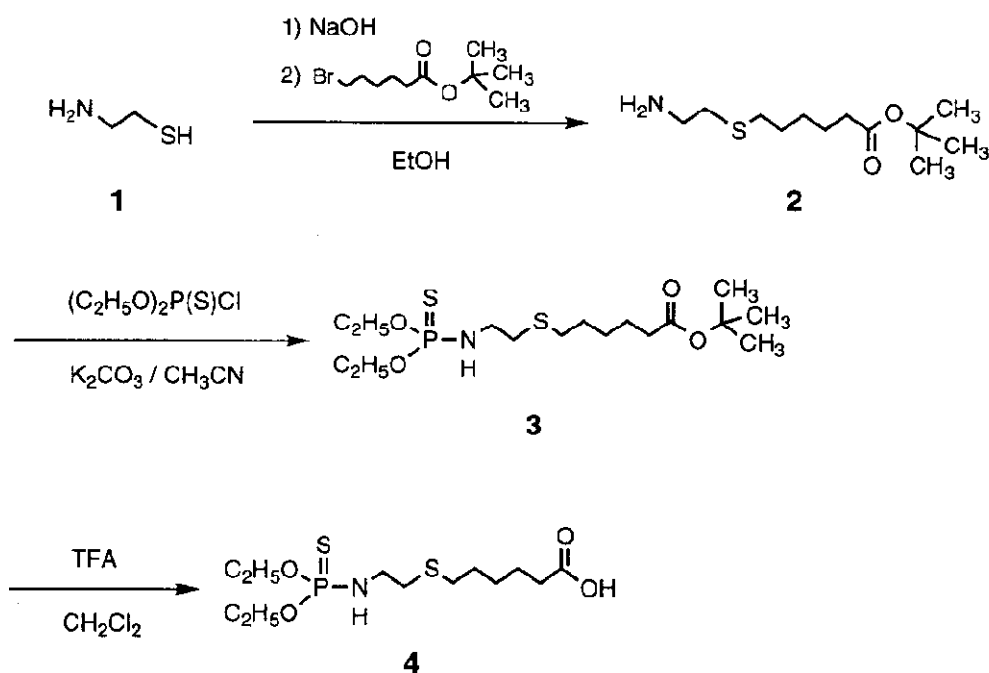
【0122】

【実施例】実施例1 エチルチオメトンハプテン-1の合成

【0123】

【化20】

反応式 - 1



【0124】化合物(2)の合成

0.23 g (3 mmol) の化合物(1) をエタノール 50 ml に加えて、水酸化ナトリウム 0.12 g (3 mmol) を添加後に室温で 30 分撹拌した。6-ブロモヘキサン酸 tert-ブチル 0.77 g (3 mmol) のエタノール溶液 5 ml を滴下した。50 で 30 分撹拌後に、濃縮してシリカゲルカラム(酢酸エチル:クロロホルム:メタノール = 9:1)で精製し、無色油状物として 0.6 g (収率 81%) の化合物(2)を得た。

【0125】上記化合物(2)の ^1H -NMRによる物性データ(ケミカルシフト δ)を以下に示す。

【0126】

【表1】 ^1H -NMR (CDCl_3)

1.33 - 1.49 (2H, m), 1.53 - 1.68 (4H, m)
2.13 - 2.27 (2H, t), 2.46 - 2.55 (2H, t)
2.57 - 2.65 (2H, t), 2.83 - 2.90 (2H, m)

化合物(3)の合成

3.8 g (15 mmol) の化合物(2) とクロロリン酸ジエチル 3.0 g (15 mmol) をアセトニトリル 150 ml に溶解して、炭酸カリウム 2.1 g (15 mmol) を加えて 50 で 1 時間撹拌した。反応混合物をセライトろ過、濃縮してシリカゲルカラム(n-ヘキサン:酢酸エチル = 49:1 → 19:1 → 9:1)で精製し、無色油状物として 2.2 g (収率 36%) の化合物(3)を得た。

【0127】上記化合物(3)の ^1H -NMRによる物性データ(ケミカルシフト δ)を以下に示す。

【0128】

【表2】 ^1H -NMR (CDCl_3)

1.27 - 1.38 (6H, t), 1.38 - 1.52 (11H, 重複)
1.52 - 1.68 (4H, m), 2.17 - 2.24 (2H, t)
2.46 - 2.53 (2H, t), 2.58 - 2.67 (2H, t)
3.04 - 3.19 (2H, m), 3.37 - 3.51 (1H, m)
3.97 - 4.13 (4H, m)

化合物(4)の合成

2.2 g (5.5 mmol) の化合物(3) を 100 ml のジクロロメタンに溶解させ、トリフルオロ酢酸(TFA) 5 ml を加えて室温で 1 時間撹拌し、更に TFA 5 ml を添加後 1 時間撹拌した。反応液を濃縮してシリカゲルカラム(n-ヘキサン:酢酸エチル = 4:1 → 1:1)で精製し、無色油状物として 1.55 g (収率 82%) の化合物(4)を得た。

【0129】上記エチルチオメトンハプテン-1(4)の ^1H -NMRによる物性データ(ケミカルシフト δ)を以下に示す。

【0130】

【表3】 ^1H -NMR (CDCl_3)

1.26 - 1.35 (6H, t), 1.39 - 1.51 (2H, m)
1.53 - 1.72 (4H, m), 2.30 - 2.40 (2H, t)
2.44 - 2.55 (2H, t), 2.60 - 2.67 (2H, t)

23

24

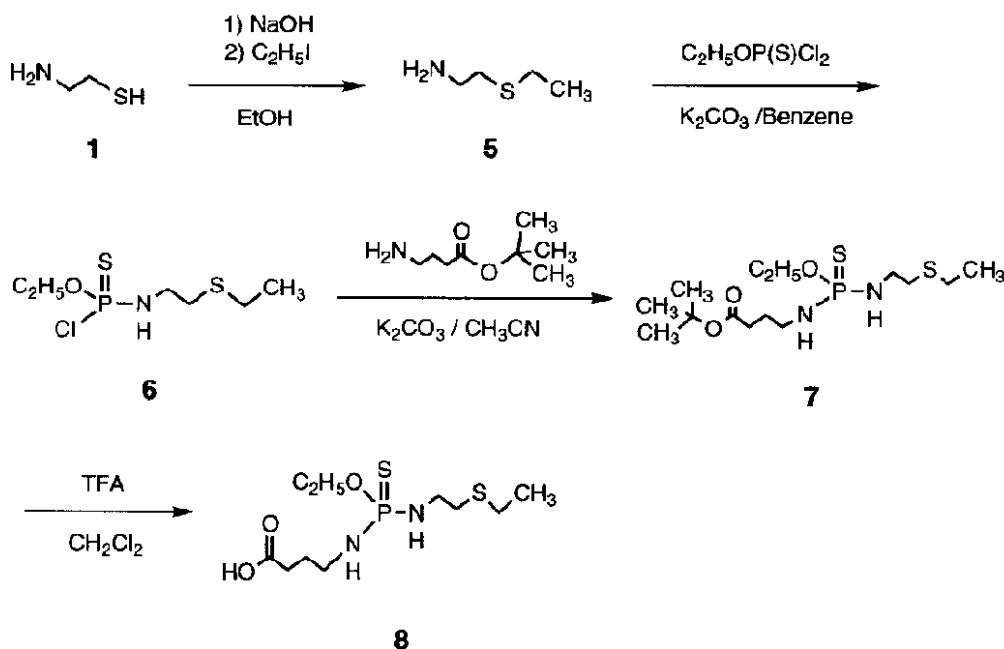
3.04 - 3.19 (2H, m)、3.26 - 3.61
(1H, br)

*実施例2 エチルチオメトンハブテン-2の合成
【0131】

3.96 - 4.12 (4H, m)

* 【化21】

反応式-2



【0132】化合物(5)の合成

5.4 g (70 mmol) の化合物(1) をエタノール 50 ml に加えて、水酸化ナトリウム 2.8 g (70 mmol) を添加後に室温で 30 分撹拌した。ヨウ化エチル 13 g (83 mmol) を滴下して、50 で 30 分撹拌後に、濃縮してシリカゲルカラム(酢酸エチル→クロロホルム:メタノール=9:1)で粗精製した。

【0133】化合物(6)の合成

6.0 g (最大 57 mmol) の化合物(5) を含む粗精製物とジクロロリン酸エチル 10.2 g (57 mmol) をベンゼン 100 ml に加えて、炭酸カリウム 7.9 g (57 mmol) を加えて室温で一晩撹拌した。反応混合物をセライトろ過、濃縮してシリカゲルカラム(n-ヘキサン:酢酸エチル=49:1→9:1)で精製し、無色油状物として 0.5 g (化合物(1)からの通算収率 3%) の化合物(6)を得た。

【0134】上記化合物(6)の¹H-NMRによる物性データ(ケミカルシフトδ)を以下に示す。

【0135】

【表4】¹H-NMR(CDCl₃)

1.21 - 1.32 (3H, t)、1.33 - 1.45 (3H, t)
1.50 - 1.60 (2H, q)、1.69 - 1.78 (2H, t)
3.20 - 3.37 (2H, m)、4.09 - 4.36 (3H, 重複)

化合物(7)の合成

0.5 g (2 mmol) の化合物(6)、4-アミノ酪酸 tert-ブチル 0.32 g (2 mmol)、炭酸カリウム 0.28 g (2 mmol) をアセトニトリル 100 ml に加えて 50 で 30 分撹拌した。反応混合物をろ過、濃縮してシリカゲルカラム(n-ヘキサン:酢酸エチル=19:1→4:1)で精製し、無色油状物として、0.54 g (収率 73%) の化合物(7)を得た。

【0136】上記化合物(7)の¹H-NMRによる物性データ(ケミカルシフトδ)を以下に示す。

【0137】

【表5】¹H-NMR(CDCl₃)

1.21 - 1.33 (6H, 重複)、1.45 (9H, s)
1.71 - 1.85 (2H, m)、2.23 - 2.32 (2H, t)
2.49 - 2.60 (2H, q)、2.67 - 2.80 (3H, 重複)
2.90 - 3.01 (2H, m)、3.06 - 3.20 (2H, m)
3.97 - 4.14 (2H, m)

化合物(8)の合成

540 mg (1.46 mmol) の化合物(7) を 100 ml のジクロロメタンに溶解させ、TFA 10 ml を加えて室温で 1 時間撹拌した。反応液を濃縮してシリカゲルカラム(酢酸エチル:ヘキサン=4:1→1:1)で精製し、無色油状物として 250 mg (収率 55%) の化合物(8)を得た。上記エチルチオメトンハブテン

- 2 (8) の¹H - NMRによる物性データ (ケミカルシフトδ) を以下に示す。

【 0 1 3 8 】

【表6】¹H - NMR (C D C l ₃)

1 . 1 9 - 1 . 3 7 (6 H , 重複)、1 . 7 7 - 1 . 9 0 (2 H , m)

2 . 3 7 - 2 . 4 9 (2 H , t)、2 . 4 9 - 2 . 5 9 (2 H , q)

2 . 6 1 - 2 . 7 2 (2 H , t)、2 . 9 2 - 3 . 1 8 (4 H , m)

3 . 9 9 - 4 . 1 7 (2 H , m)

実施例3 免疫用抗原及びスクリーニング用抗原の作製
免疫用抗原及びスクリーニング用抗原としてエチルチオメトンハプテンとBSAとの結合体を活性化エステル法を用いて作製した。

【 0 1 3 9 】実施例1で作製したエチルチオメトンハプテン - 1 の 0 . 2 m m o l を D M F 1 . 0 m l に溶解し、N - ヒドロキシこはく酸イミド 0 . 2 m m o l 及び 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド 0 . 2 m m o l を加え、室温で 3 . 5 時間攪拌した。反応後、1 0 0 0 0 r p m で 1 5 分間遠心し、上清と沈殿に分離した。この上清を、以下「A液」という。

【 0 1 4 0 】一方、BSA 5 0 m g を 1 4 5 m M N a C l - 0 . 0 1 M リン酸緩衝液 (p H 7 . 2 : 以下「PBS」と言う) 5 . 0 m l に溶解し、DMF 1 . 0 5 m l を加えた溶液を調製しておき、この溶液にA液 0 . 2 5 m l を加え、4 にて 1 6 時間反応させた。反応後、蒸留水にて 4 で透析して得たエチルチオメトンハプテン - 1 とBSAとの結合体 (以下、「エチルチオメトンハプテン - 1 / BSA」と言う) を免疫用抗原として用いた。

【 0 1 4 1 】また、同様の方法を用いて、エチルチオメトンハプテン - 1 とRSAとの結合体 (以下、「エチルチオメトンハプテン - 1 / RSA」と言う)、エチルチオメトンハプテン - 1 とHRPとの結合体 (以下、「エチルチオメトンハプテン - 1 / HRP」と言う) も作製した。

【 0 1 4 2 】実施例4 免疫感作

免疫にはBalb/cマウスを用いた。実施例3で作製したエチルチオメトンハプテン - 1 / BSA 5 0 μ g を PBS 1 0 0 μ l に溶解し、等量のフロイント完全アジュバンドと混合して、Balb/cマウスの皮下に接種した。その4週間後に免疫用抗原 5 0 μ g とフロイント不完全アジュバンドを前記と同様に混合し、マウスの皮下に追加免疫した。さらにその2週間後に、PBS 1 8 0 μ l に溶解した免疫用抗原 1 0 μ g をマウス尾静脈より追加免疫した。

【 0 1 4 3 】実施例5 抗血清のエチルチオメトンに対する反応性

実施例4におけるマウス尾静脈への接種直前、採血した抗血清を希釈調製して、以下に詳述する間接競合ELISA法にてエチルチオメトン測定し、抗血清を評価した。

【 0 1 4 4 】免疫用抗原と同様に調製したエチルチオメトンハプテン - 1 / RSAのPBS溶液 (0 . 5 μ g / m l) を 5 0 μ l / ウェルの量で 9 6 ウェルマイクロプレートにコーティングし (2 5 n g / 5 0 μ l / ウェル)、4 倍希釈したブロックエース (「Block Ace」、雪印乳業社製、コードNo. UK - 2 5 B) でブロッキングしてアッセイ用プレートを作製した。次いで、このプレートに抗血清 5 0 0 0 倍希釈液と、各種濃度のエチルチオメトンを含む 2 0 % メタノール溶液とを等量混合し、その 5 0 μ l を各ウェルに入れ、室温で 1 時間反応させた。

【 0 1 4 5 】PBSで5回洗浄した後に、1 0 倍希釈のブロックエースを用いて 2 0 0 0 倍に希釈したペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgG抗体 (Tago社製) を 5 0 μ l / ウェルの量で加え、室温で 1 時間反応させた。PBSで5回洗浄した後に、2 m g / m l のOPD及び 0 . 0 2 % の過酸化水素を含む 0 . 1 M クエン酸 - リン酸緩衝液 (p H 5 . 0) を 5 0 μ l / ウェルの量で加え、室温にて 1 0 分間反応させて発色させた。

【 0 1 4 6 】次に、1 N硫酸を 5 0 μ l / ウェルの量で加えて反応を停止し、4 9 0 n m の吸光度を測定した。結果の一例を図1に示す。図1より、マウスの抗血清 (ポリクローナル抗体) を使用することにより、エチルチオメトンの量を 0 . 0 1 - 1 0 0 μ g / m l の範囲で測定できることが確認された。

【 0 1 4 7 】実施例6 ハイブリドーマの作製

実施例4に続いて、血清中の抗エチルチオメトン抗体活性が高くなったマウスの脾細胞と、ミエローマ細胞 (Sp2/0 - Ag14) とを山下修二らの方法 (組織細胞化学 : 日本組織細胞化学会編 : 学際企画 . 1 9 8 6 年) に従ってポリエチレングリコール法により融合し、培養した。実施例5と同様の方法でコーティング及びブロッキングしたプレートに細胞の増殖が認められた培養上清液をそれぞれ 5 0 μ l / ウェルの量で加え、室温にて 1 時間反応させた。

【 0 1 4 8 】PBSで5回洗浄した後、1 0 倍希釈のブロックエースを用いて 2 0 0 0 倍に希釈したペルオキシダーゼ結合抗マウスIgGヤギ抗体 (Tago社製) を 5 0 μ l / ウェルの量で加え、室温で 1 時間反応させた。PBSで5回洗浄した後に、2 m g / m l のOPD及び 0 . 0 2 % の過酸化水素を含む 0 . 1 M クエン酸 - リン酸緩衝液 (p H 5 . 0) を 5 0 μ l / ウェルの量で加え、室温で 1 0 分間発色反応させた。

【 0 1 4 9 】次に、1 N硫酸を 5 0 μ l / ウェルの量で加えて、反応を停止し、4 9 0 n m の吸光度を測定し、反応性を示す細胞 (ハイブリドーマ) を選抜した。次

に、各ウェルのエチルチオメトンとの反応性を実施例5に記載した間接競合ELISA法で調べ、目的の抗体を産生している細胞について限界希釈法によりクローニングを行った。その結果、数株のハイブリドーマが抗エチルチオメトン抗体を産生する細胞としてクローン化された。そのうちの44K7-1-1を平成12年2月15日に、寄託番号FERM P-17732で、工業技術院生命工学工業技術研究所（〒305-0046茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託した。

【0150】実施例7 直接競合阻害ELISAによるエチルチオメトンの測定

実施例6で得られたハイブリドーマ44K7-1-1をマウスの腹腔に移植し、10日ないし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。（以降、モノクローナル抗体は、これらを産生するハイブリドーマと同一の名称を用いる。）この44K7-1-1抗体を用いて直接競合ELISA法にてエチルチオメトンの量を測定した。

【0151】上記の44K7-1-1抗体溶液（5μg/ml）を50μl/ウェルの量で96ウェルマイクロプレートに入れ、4で一晚静置してコーティングし、さらに4倍希釈のブロックエース（雪印乳業社製）でブロッキングを行い、アッセイ用のプレートを作製した。各種濃度のエチルチオメトンを含む10%メタノール溶液と、実施例3で作製したエチルチオメトンハプテン-

1/HRPを含むPBS溶液との等量混合液を50μlずつ各ウェルに入れ、25で1.5時間反応させた。

【0152】反応後、PBSで5回洗浄した後、2mg/mlのOPD及び0.02%の過酸化水素を含む0.1Mクエン酸-リン酸緩衝液（pH5.0）を50μlずつ各ウェルに入れ、室温で10分間静置して発色反応を行った。

【0153】次に、1N硫酸を50μlずつ各ウェルに加えて発色反応を停止させ、490nmの吸光度を測定した。この結果を図2に示す。図2より、直接競合ELISA法において、本発明のモノクローナル抗体44K7-1-1は、エチルチオメトンを0.2ng/mlないし50ng/mlの範囲で測定できることが確認できた。

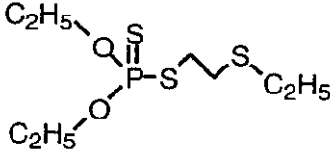
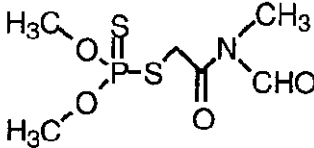
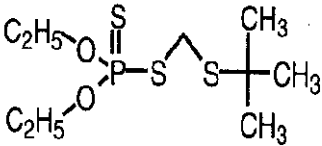
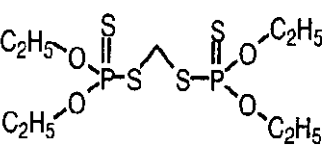
【0154】実施例8 モノクローナル抗体の交差反応性の評価

実施例6で得られたハイブリドーマ44K7-1-1に由来するモノクローナル抗体44K7-1-1について、その培養上清を用いて実施例5に記載した間接競合ELISA法により、3種類のエチルチオメトン類縁化合物に対する交差反応性を検討した。この結果を表7に示す。

【0155】

【表7】

29
表7. モノクローナル抗体44K7-1-1のエチルチオメトン
類縁化合物に対する反応性

		交差反応率 (%) ^a (IC ₅₀ [pmol/mL] ^b) 44K7-1-1
	エチルチオメトン	100 (13)
	ホルモチオン	<0.01 (300000)
	テルブホス	5.7 (230)
	エチオン	0.6 (2300)

a= (エチルチオメトンのIC₅₀ / 対象化合物のIC₅₀) × 100 (%)
b=50%阻害濃度

【0156】表7中、交差反応率(%)は、エチルチオメトンのIC₅₀/対象化合物のIC₅₀)×100(%)で定義される。エチルチオメトンと類縁化合物の交差反応率の数値が乖離している程、エチルチオメトンと特異的に反応する抗体である。また、IC₅₀(pmol/mL)は、エチルチオメトン等の化合物を添加しない反応溶液の吸光度に対して吸光度を50%減少させる反応溶液中の対象化合物の濃度を示す。

【0157】表7より、モノクローナル抗体44K7-1-1は、エチルチオメトンに対して反応性を示した 10

が、エチルチオメトン類縁化合物に対しては交差反応率が低く、ほとんど反応性を示さなかった。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明のエチルチオメトンハプテン-1/BSAを用いて得られた抗血清の間接競合ELISA法によるエチルチオメトンとの反応性を示す。

【図2】図2は、本発明のモノクローナル抗体44K7-1-1を用いた直接競合ELISA法によるエチルチオメトンとの反応性を示す。

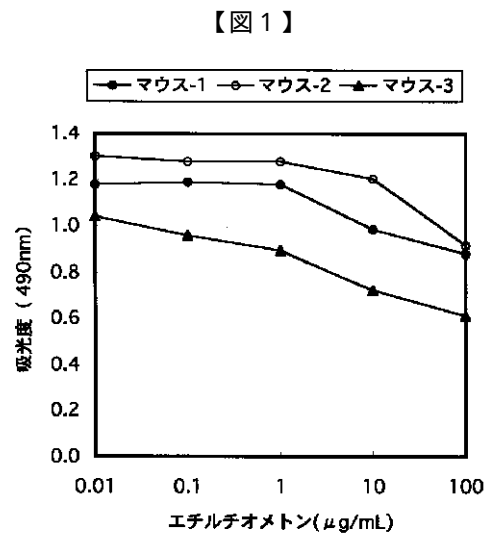


図1 マウス抗血清の評価

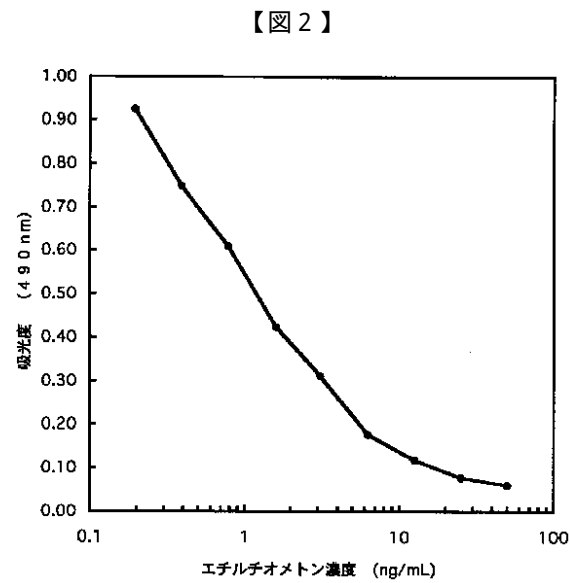


図2 44K7-1-1抗体を用いたエチルチオメトンの測定（直接競合ELISA法）

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ド ⁷ (参考)
C 1 2 P 21/08		G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/563	
	33/577	C 1 2 R 1:91)	
// G 0 1 N 33/563		C 1 2 N 5/00	B
(C 1 2 N 5/10		15/00	C
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 R 1:91)	
(72)発明者 山崎 哲男		F タ-ム(参考)	4B024 AA11 BA41 GA03 GA09 GA27
東京都港区浜松町 1 丁目27番14号 株式会			HA03
社環境免疫技術研究所内			4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24
(72)発明者 面田 内記			CE04 DA13
東京都港区浜松町 1 丁目27番14号 株式会			4B065 AA91X AB05 AC14 AC15
社環境免疫技術研究所内			BA08 BA24 BC01 BD14 BD50
(72)発明者 鎌田 良雄			CA25 CA46
東京都港区浜松町 1 丁目27番14号 株式会			4H045 AA11 AA20 AA30 DA76 EA50
社環境免疫技術研究所内			FA72 GA06
(72)発明者 渡邊 繁幸			4H050 AB81 AC60 BA92 BB21 BE12
東京都港区浜松町 1 丁目27番14号 株式会			WA15 WA27 WA28
社環境免疫技術研究所内			

专利名称(译)	乙基硫脲酮的Haptene化合物，抗体和测定方法		
公开(公告)号	JP2001233884A	公开(公告)日	2001-08-28
申请号	JP2000049448	申请日	2000-02-25
申请(专利权)人(译)	株式会社环境免疫技术研究所		
[标]发明人	森宗孝介 金子隆司 山崎哲男 面田内記 鎌田良雄 渡邊繁幸		
发明人	森宗 孝介 金子 隆司 山崎 哲男 面田 内記 鎌田 良雄 渡邊 繁幸		
IPC分类号	G01N33/53 C07F9/165 C07F9/24 C07K16/44 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/563 G01N33/577		
FI分类号	C07F9/165.L C07F9/24.G C07K16/44 C12P21/08 G01N33/53.G G01N33/577.B G01N33/563 C12R1/91 C12N5/00.B C12N15/00.C C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/GA03 4B024/GA09 4B024/GA27 4B024/HA03 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/CE04 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/AC15 4B065/BA08 4B065/BA24 4B065/BC01 4B065/BD14 4B065/BD50 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA06 4H050/AB81 4H050/AC60 4H050/BA92 4H050/BB21 4H050/BE12 4H050/WA15 4H050/WA27 4H050/WA28		
其他公开文献	JP2001233884A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供乙硫基甲酮类似物的半抗原化合物，抗体和测量方法。 本发明的半抗原化合物具有其中间隔臂和用于键合的官能团与乙硫基甲酮类似物化合物或其一部分共价键合的结构。

