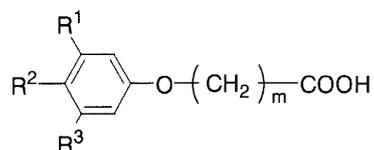


【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式

【化1】



で表されるカルボン酸を、固相結合抗原または標識抗原の抗原として用いる有機ハロゲン化合物の免疫測定法 (式中、 R^1 は低級アルキル基、 R^2 はハロゲン原子、 R^3 は低級アルキル基または水素原子であり、 m は5ないし7の整数である。)

【請求項2】 m が5である請求項1に記載の免疫測定法。

【請求項3】 R^1 および R^3 がメチル基、 R^2 が塩素原子である請求項1または2に記載の免疫測定法。

【請求項4】 R^1 がエチル基、 R^2 が塩素原子、 R^3 が水素原子である請求項1または2に記載の免疫測定法。

【請求項5】 固相に結合された請求項1ないし4のいずれかに記載の化合物と、検体中の有機ハロゲン化合物との競合反応を利用する、請求項1記載の免疫測定法。

【請求項6】 請求項1ないし4のいずれかに記載の化合物が、キャリアープロテインを介して結合している抗原結合固相を用いる請求項5記載の免疫測定法。

【請求項7】 標識された請求項1ないし4のいずれかに記載の化合物と、検体中の有機ハロゲン化合物との競合反応を利用する、請求項1記載の免疫測定法。

【請求項8】 有機ハロゲン化合物が、PCBまたはダイオキシンである請求項1ないし7のいずれかに記載の免疫測定法。

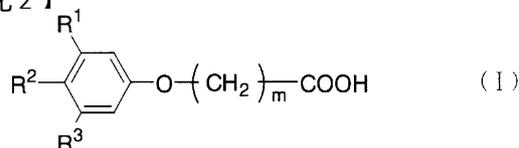
【請求項9】 請求項1ないし8のいずれかに記載の免疫測定法を実施するための免疫測定キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、一般式

【化2】



(1)

(式中、 R^1 は低級アルキル基、 R^2 はハロゲン原子、 R^3 は低級アルキル基または水素原子であり、 m は5ないし7の整数である。)で表されるカルボン酸を用いる有機ハロゲン化合物の免疫測定法であり、該カルボン酸は、PCBやダイオキシンなどの有機ハロゲン化合物を測定するさいの固相結合抗原の抗原、または標識抗原の抗原として使用することができる。

【0002】

【従来の技術】従来、PCBやダイオキシンは、ガスクロマトグラフィーとマススペクトロメリーとを一体化した機器等を用いて測定していたが、これらの測定機器は大変高価であり、また、サンプルが土や水の場合は、これら機器測定前に濃縮操作を行わねばならず、煩雑であった。これらの問題は免疫測定法を採用することで解決することができた。この方法は、迅速かつ簡便、低コストで高感度測定ができるが、測定対象の物質が限定的であり、改良が望まれていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、簡便な有機ハロゲン化合物の測定法を提供することが目的である。さらに、本発明は広範な有機ハロゲン化合物の測定法を提供することが目的である。

【0004】

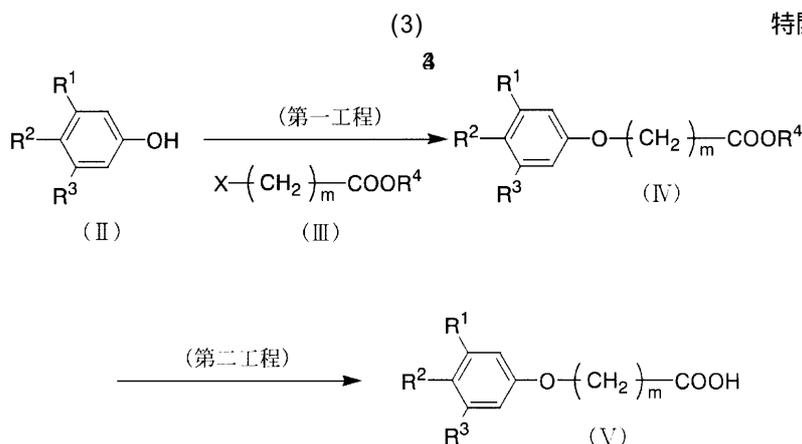
【課題を解決するための手段】かかる課題を解決するため本発明者らは、新規な前記一般式(I)で表されるカルボン酸を見出し、さらに、該カルボン酸を用いるとPCBやダイオキシンなどの有機ハロゲン化合物を免疫測定法により広汎に測定できることを見出して、本発明を完成した。

【0005】

【発明の実施の形態】本発明の前記一般式(I)で表されるカルボン酸は、以下の式に従い製造することができる。

【0006】

【化3】



【0007】(式中、 R^1 は低級アルキル基、 R^2 はハロゲン原子、 R^3 は低級アルキル基または水素原子、 R^4 はアルキル基またはアリール基、 m は5ないし7の整数である。Xはハロゲン原子である。)

【0008】(第一工程)本工程は、前記一般式(IV)で表わされるエステル誘導体を、一般式(II)で表される置換フェノールと一般式(III)で表されるハロ脂肪酸エステルとを塩基の存在下、反応させることにより製造する工程である。

【0009】前記一般式(II)で表される置換フェノールとしては、たとえば、4-クロロ-3-メチルフェノール、4-クロロ-3-エチルフェノール、4-クロロ-3,5-ジメチルフェノール、4-クロロ-3,5-ジエチルフェノール、4-クロロ-5-エチル-3-メチルフェノール、4-ブromo-3-メチルフェノール、4-ブromo-3-エチルフェノール、4-ブromo-3,5-ジメチルフェノール、4-ブromo-3,5-ジエチルフェノール、4-ブromo-5-エチル-3-メチルフェノール、4-フルオロ-3-メチルフェノール、4-フルオロ-3-エチルフェノール、4-フルオロ-3,5-ジメチルフェノール、4-フルオロ-3,5-ジエチルフェノール、4-フルオロ-5-エチル-3-メチルフェノール等を挙げることができる。また、一般式(III)で表されるハロ脂肪酸エステルとしては、たとえば、6-ブromoヘキサン酸エチル、6-ブromoヘキサン酸メチル、6-ブromoヘキサン酸t-ブチル、7-ブromoヘプタン酸エチル、7-ブromoヘプタン酸メチル、7-ブromoヘプタン酸t-ブチル、8-ブromoオクタン酸エチル、8-ブromoオクタン酸メチル、8-ブromoオクタン酸t-ブチル、6-クロロヘキサン酸エチル、6-クロロヘキサン酸メチル、6-クロロヘキサン酸t-ブチル、7-クロロヘプタン酸エチル、7-クロロヘプタン酸メチル、7-クロロヘプタン酸t-ブチル、8-クロロオクタン酸エチル、8-クロロオクタン酸メチル、8-クロロオクタン酸t-ブチルなどを使用することができる。

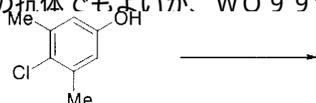
【0010】(第二工程)本工程は、一般式(IV)で表わされる化合物を加水分解することにより、一般式(V)で表わされるカルボン酸を製造する工程である。

【0011】本発明は、前記一般式(I)で表されるカルボン酸を用いて、免疫測定方法により有機ハロゲン化合物を測定するものである。本発明の競合反応法は、測定対象物質である有機ハロゲン化合物を認識する抗体と、検体中の有機ハロゲン化合物と、試薬として用いる前記一般式(I)で表されるカルボン酸とを競合させることを基本原理とする免疫測定方法であり、固相结合抗原を用いる方法と固相结合抗体を用いる方法との2通りがある。すなわち、固相に結合したカルボン酸と標識抗体と検体とを競合反応させ、固相に結合した標識抗体量に基づく応答を測定したり、固相结合抗体と標識されたカルボン酸と検体とを競合反応させ、固相に結合した標識抗原(標識されたカルボン酸)量に基づく応答を測定する等の方法を意味する。

【0012】前記一般式(I)で表されるカルボン酸と、キャリアープロテインまたは標識物質とを結合させるには、共有結合が好ましく、該結合には公知の技術に適宜用いることができる。結合方法としては、例えば、活性エステル法、混合酸無水物法、縮合剤を用いる方法などが挙げられる。ここで、活性エステル法に用いるエステルとしては、例えば、ヒドロキシスクシンイミドエステル、N-ヒドロキシフタルイミドエステル、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミドエステル等のN-ヒドロキシアミン系活性エステル、p-ニトロフェニルエステル、ペンタクロロフェニルエステル、2,4,5-トリクロロフェニルエステル等のo-, p-位に電子吸引性の置換基の入ったフェニルエステル系活性エステル、8-ヒドロキシキノリルエステル、5-クロロ-8-ヒドロキシキノリルエステル等の二価官能性活性エステルなどを挙げることができるが、操作性の面からヒドロキシスクシンイミドエステルが好ましい。また、縮合剤としては、DCC(N,N-Dicyclohexyl carbodiimide)、CMC(1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbodiimide)、DIC(Diisopropyl carbodiimide)、WSC(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride)、Woodward's Reagent K(N-ethyl-3-phenylisoxazolium-3'-sulfonate)、CDI(N,N-Carbonyldiimidazole)などを挙げることができる。

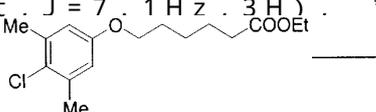
【0013】本発明の免疫測定に用いる標識物質は、標識物質を検出する応答を与える物質であり、例えば、酵素、放射性同位元素、蛍光物質、発光物質等が挙げられるが、測定対象が有機ハロゲン化合物であることから、酵素を採用することが好ましい。酵素標識抗体の酵素としては、測定系により影響のない酵素、例えば、アルカリフォスファターゼ等を使用できる。

【0014】本発明に使用するキャリアープロテインとしては、KLH、BSA等を挙げることができ、有機ハロゲン化合物を認識する抗体は、本発明を実施すること
10 ができる抗体ならばいずれの抗体でもよいが、WO99*



【0018】アルゴン気流下、4-クロロ-3,5-ジメチルフェノール783mg(5.00mmol)の無水ジメチルホルムアミド溶液(15ml)に60%油性水素化ナトリウム200mg(5.00mmol)を加え、室温で15分間撹拌した。続いて6-プロモヘキサ
20 ン酸エチル445μl(2.50mmol)を加え、室温で24.5時間撹拌した。反応終了後、10%クエン酸水溶液で弱酸性とした後、酢酸エチルで抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残留物をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン-酢酸エチル=15:1)で精製し、6-(4-クロロ-3,5-ジメチルフェノキシ)ヘキサン酸エチル538mg(収率72.0%)を得た。

【0019】¹H-NMR(400MHz, CDC
30 l₃): 1.26(t, J=7.1Hz, 3H) . *



【0022】6-(4-クロロ-3,5-ジメチルフェ
ノキシ)ヘキサン酸エチル1.49g(5.00mmol)を酢酸5mlに溶解し、濃塩酸2mlを加え、4.75時間加熱還流した。反応終了後、飽和炭酸水素ナ
40 リウム水溶液で中和し、析出した結晶を濾取し、エーテル-ヘキサンから再結晶し、6-(4-クロロ-3,5-ジメチルフェノキシ)ヘキサン酸1.02g(収率75.1%)を得た。

【0023】mp: 93.0~94.0

¹H-NMR(400MHz, CDC l₃): 1.47~1.56(m, 2H), 1.66~1.82(m, 4H), 2.33(s, 6H), 2.39(t, J=7.5Hz, 2H), 3.91(t, J=6.3Hz, 2

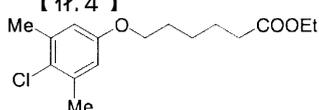
* / 43799に記載のモノクローナル抗体は、感度を向上させる上からも好ましい。なお、本発明により測定できる有機ハロゲン化合物は、PCB、ダイオキシン等である。

【0015】以下、参考例及び実施例により本発明をさらに詳細を説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0016】参考例1 6-(4-クロロ-3,5-ジメチルフェノキシ)ヘキサン酸エチルの合成

【0017】

【化4】



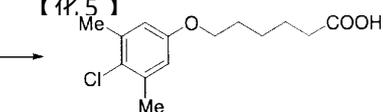
* 1.44~1.53(m, 2H), 1.65~1.74(m, 2H), 1.74~1.81(m, 2H), 2.33(t, J=7.4Hz, 2H), 2.33(s, 6H), 3.90(t, J=6.4Hz, 2H), 4.13(q, J=7.1Hz, 2H), 6.62(s, 2H) ppm.

IR(liquid film): 2948, 1738, 1592, 1472, 1324, 1168 cm⁻¹
Mass(m/z, %): 300(M⁺+2, 14), 298(M⁺, 40), 158(30), 156(92), 143(100), 115(21), 97(38), 69(30).

【0020】参考例2 6-(4-クロロ-3,5-ジメチルフェノキシ)ヘキサン酸の合成

【0021】

【化5】



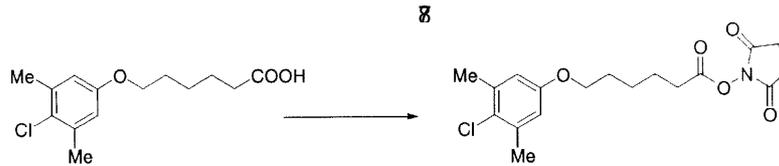
H), 6.62(s, 2H) ppm.

IR(KBr): 3060, 2956, 1716, 1588, 1470, 1326, 1232, 1172, 1044 cm⁻¹
Mass(m/z, %): 272(M⁺+2, 8), 270(M⁺, 23), 158(31), 156(100).

【0024】参考例3 N-スクシンイミジル-6-(4-クロロ-3,5-ジメチルフェノキシ)ヘキサエートの合成

【0025】

【化6】



【0026】6-(4-クロロ-3,5-ジメチルフェノキシ)ヘキサン酸890mg(3.62mmol)の無水ジクロロメタン溶液(5ml)に、N-ヒドロキシスクシンイミド500mg(4.34mmol)、塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド833mg(4.34mmol)を加え、室温で5時間撹拌した。反応終了後、10%クエン酸水溶液で弱酸性とした後、酢酸エチルで抽出し、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。エーテル-酢酸エチル-ヘキサンから再結晶し、N-スクシンイミジル-6-(4-クロロ-3,5-ジメチルフェノキシ)ヘキサノエート925mg(収率76.5%)を得た。

【0027】mp:100.0~101.5
¹H-NMR(400MHz,CDCl₃):1.55~1.63(m,2H),1.76~1.87(m,4H),2.34(s,6H),2.65(t,J=7.4Hz,2H),2.84(bs,4H),3.92(t,J=6.3Hz,2H),6.63(s,2H)ppm.

IR(KBr):2952,1814,1786,1754,1590,1472,1324,1218,1172,1074cm⁻¹

Mass(m/z,%):369(M⁺+2,14),367(M⁺,44),255(8),253(23),158(32),156(100),97(57),69(54).

【0028】参考例4 ウシ血清アルブミン(BSA)結合4-クロロ-3,5-ジメチルフェノキシ誘導体の合成

ウシ血清アルブミン5.0mgを0.1Mのリン酸緩衝液(pH7.5)900μlに溶解し、N-スクシンイミジル-6-(4-クロロ-3,5-ジメチルフェノキシ)ヘキサノエート1.0mgの無水ジメチルホルムアミド溶液100μlを加え、室温で5時間撹拌した。その後反応液をPBS中で透析し脱塩して、標記BSA結合4-クロロ-3,5-ジメチルフェノキシ誘導体を得た。

【0029】参考例5 ウシ血清アルブミン結合4-クロロ-3,5-ジメチルフェノキシ誘導体感作粒子の作成
 カルボキシル化粒子(日本ペイント社製)を0.1Mリン酸緩衝液(pH5.0)にて3回洗浄し、同緩衝液1mlにて懸濁後、5~40μg/mlに調整した参考例4で作成したBSA結合4-クロロ-3,5-

ジメチルフェノキシ誘導体溶液1mlを添加し252時間、ローテーターにて回転反応させた。粒子洗浄後、0.05Mメス緩衝液(pH5.5)1mlに懸濁し、80mg/mlの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(ナカライタス社製)水溶液を50μl添加して、ローテーターで25~30分回転反応させた。粒子を洗浄後、ポストコート緩衝液を2ml添加しローテーターで37~1晩回転反応させた。粒子を洗浄後、粒子濃度を1.5%に合わせてウシ血清アルブミン結合4-クロロ-3,5-ジメチルフェノキシ誘導体感作粒子を得た。

【0030】参考例6 アルカリフォスファターゼ(ALP)標識抗PCB#169(3,3',4,4',5,5'-ヘキサクロロビフェニル)抗体の作成
 抗PCB#169モノクローナル抗体(PCB169E抗体;KRI社製)を用い、マレイミド法にてアルカリフォスファターゼ(オリエンタル社製)を結合しALP標識抗PCB#169抗体を得た。

【0031】実施例1 PCB#169の測定
 PCB#169の測定は、全自動化学発光免疫測定システム(ルミパルスf;富士レビオ社製)を用いた1ステップ競合法にて行った。参考例5で作成したウシ血清アルブミン結合4-クロロ-3,5-ジメチルフェノキシ誘導体感作粒子150μlにPCB#169の標準抗原液90μlとALP標識抗PCB#169抗体液50μlを加え、37~20分間免疫反応を行い、洗浄後基質(AMPPD)液200μlを加えて375分間酵素反応を行い、その後発光量を測定した。

【0032】前記PCB#169の標準抗原液は、PCB#169(ジーエルサイエンス社製)を10%ジメチルスルホキシド溶液に溶解し、0~10ng/mlの濃度に調整した。標準抗原0濃度のカウント値を100%としたときの各標準抗原液の応答(B/B0(%))で標準曲線を求めた。その結果を図1に示す。

【0033】また、ウシ血清アルブミン結合4-クロロ-3,5-ジメチルフェノキシ誘導体感作粒子を用いたPCB#169測定系に対するPCB同族体の交叉反応性と、比較的毒性の高い(毒性等価係数;TEF0.1以上)ダイオキシン11種との交叉反応性の測定結果を表1および表2に示す。その結果、PCB#169測定系では、PCBおよびダイオキシンの同族体と多数交叉反応性を示した。

【0034】

【表1】

910
PCB同族体の交叉反応性*

PCB	BSA結合4クロロ3,5,ジメチルフェノール誘導体
	PCB#169測定系
3,3',4,4'-TCB(77)	9.2
3,4,4',5'-TCB(81)	4.7
2,3,3',4,4'-PeCB(105)	-
2,3,4,4',5'-PeCB(114)	-
2,3',4,4',5'-PeCB(118)	-
2',3,4,4',5'-PeCB(123)	-
3,3',4,4',5'-PeCB(126)	39.1
2,3,3',4,4',5'-HxCB(156)	-
2,3,3',4,4',5'-HxCB(157)	-
2,3',4,4',5,5'-HxCB(167)	-
3,3',4,4',5,5'-HxCB(169)	-
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB(189)	-

*50%阻害率の濃度の割合から求めた(単位 %)

【0035】

* * 【表2】
PCB#169測定系に対するDioxinの交叉反応性*

Dioxine	BSA結合4クロロ3,5,ジメチルフェノール誘導体
	PCB#169測定系
2,3,7,8-TCDD	-
1,2,3,7,8-PeCDD	21.5
1,2,3,4,7,8-HeCDD	-
1,2,3,6,7,8-HeCDD	7
1,2,3,7,8,9-HeCDD	-
2,3,7,8-TCDF	1.6
2,3,4,7,8-PeCDF	67.1
1,2,3,4,7,8-HeCDF	-
1,2,3,6,7,8-HeCDF	3.2
1,2,3,7,8,9-HeCDF	-
2,3,4,6,7,8-HeCDF	11.5

*50%阻害率の濃度の割合から求めた(単位 %)

【0036】

【発明の効果】本発明の一般式(I)で表される置換フェノキシカルボン酸は、PCB等の有機ハロゲン化合物を測定するための試薬として有用である。本発明の一般式(I)で表される置換フェノキシカルボン酸は、例え

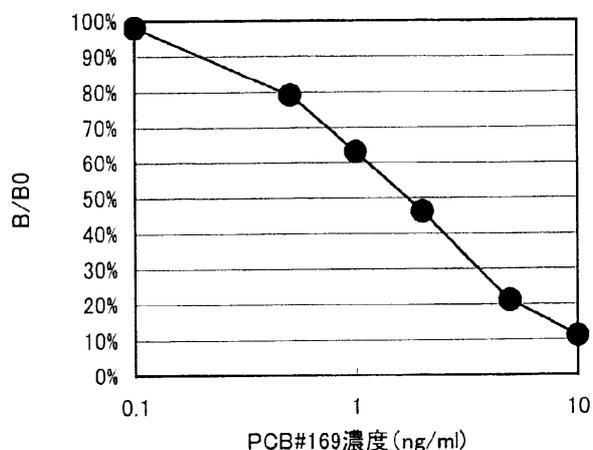
ばBSAと結合させて、酵素免疫測定法によるPCB等の有機ハロゲン化合物の測定に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】PCB#169を測定したときの標準曲線を示す。

【図1】

PCB#169 STD Assay



【手続補正書】

【提出日】平成13年2月20日(2001.2.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正内容】

【0014】本発明に使用するキャリアープロテインと

しては、KLH、BSA等を挙げることができ、有機ハロゲン化合物を認識する抗体は、本発明を実施することができる抗体ならばいずれの抗体でもよいが、特開2000-191699に記載のモノクローナル抗体は、感度を向上させる上からも好ましい。なお、本発明により測定できる有機ハロゲン化合物は、PCB、ダイオキシン等である。

专利名称(译)	有机卤素化合物的免疫测定		
公开(公告)号	JP2002195998A	公开(公告)日	2002-07-10
申请号	JP2000397170	申请日	2000-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	富士瑞必欧株式会社		
申请(专利权)人(译)	FUJIREBIO		
[标]发明人	大村正史 丹羽敏博		
发明人	大村 正史 丹羽 敏博		
IPC分类号	G01N33/53 C07C59/135		
FI分类号	G01N33/53.S C07C59/135		
F-TERM分类号	4H006/AA03 4H006/AB20 4H006/AB80 4H006/BJ50 4H006/BM30 4H006/BM72 4H006/BP30 4H006/BS10		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种通过酶免疫测定法测量多种有机卤素化合物（如PCB和二恶英）的方法，而不是传统的复杂测量方法。解决方案：通用公式（其中，R¹为低级烷基，R²为卤原子，R³为低级烷基或氢原子，有机卤素化合物可以通过免疫测定法测量，使用由m）表示的羧酸作为固相结合抗原或标记抗原的抗原作为5至7的整数。

