

(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2005-257351**(P2005-257351A)**(43) 公開日 **平成17年9月22日(2005.9.22)**(51) Int.Cl.⁷**G01N 33/53**

F I

G O 1 N 33/53

S

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2004-66750 (P2004-66750)	(71) 出願人	000105567
(22) 出願日	平成16年3月10日 (2004.3.10)		コスモ石油株式会社
			東京都港区芝浦1丁目1番1号
		(74) 代理人	110000084
			特許業務法人アルガ特許事務所
		(74) 代理人	100068700
			弁理士 有賀 三幸
		(74) 代理人	100077562
			弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736
			弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100089048
			弁理士 浅野 康隆
		(74) 代理人	100101317
			弁理士 的場 ひろみ
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 有機塩素系化合物の免疫学的測定方法

(57) 【要約】

【課題】 少量の試料で高感度にダイオキシン類等の有機塩素系化合物が簡便に検出定量できる免疫学的測定方法の提供。

【解決手段】 抗原抗体反応をホルムアミド類の存在下に行うことを特徴とする有機塩素系化合物、特にダイオキシン類の免疫学的測定方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原抗体反応をホルムアミド類の存在下に行うことを特徴とする有機塩素系化合物の免疫学的測定方法。

【請求項 2】

有機塩素系化合物がダイオキシン類である請求項 1 記載の免疫学的測定方法。

【請求項 3】

ダイオキシン類と抗ダイオキシン類抗体をホルムアミド類の存在下に反応させる請求項 1 又は 2 記載の免疫学的測定方法。

【請求項 4】

抗ダイオキシン類抗体がマウス、ヒツジ、ヤギ又はウサギを免疫動物として使用して得られたものである請求項 2 又は 3 記載の免疫学的測定方法。

【請求項 5】

ダイオキシン類と抗ダイオキシン類抗体を含む反応液中のホルムアミド類濃度が 10 ～ 70 容量%である請求項 2 ～ 4 のいずれか 1 項記載の免疫学的測定方法。

【請求項 6】

ホルムアミド類がホルムアミドである請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項記載の免疫学的測定方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は改良されたダイオキシン類に代表される有機塩素系化合物の免疫学的測定方法に関する。

【背景技術】

【0002】

アルドリン、DDT、PCP、CNP等の有機塩素系農薬、ダイオキシン類、ポリ塩化ビフェニル類等の有機塩素系化合物は、環境汚染をもたらす物質として問題となっている。ダイオキシン類（ポリクロロジベンゾダイオキシン（以下、「PCDD」と記載する）とポリクロロジベンゾフラン（以下、「PCDF」と記載する）及びコプラナーポリクロロビフェニル（以下、「Co-PCB」と記載する）の総称として使用する）は、都市ゴミ焼却における燃焼生成物、あるいは有機塩素系化合物の製造過程における副生成物として非意図的に生成されることが知られており、難分解性物質であることから広く長く環境中に存在している。また、ダイオキシン類は極めて毒性が高く、人体に対する毒性評価の観点から耐容一日摂取量 4pg/kg・dayの基準が定められているほどである。ダイオキシン類は、超高感度の分析精度が要求され、試料中のダイオキシン類を分析するためには、試料中に含まれる複雑なマトリックス成分から分離し定量する必要がある。抽出、クリーンアップ、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析法という手順の測定方法が、公定法としてJISに定められている（非特許文献 1、2）。

【0003】

このように、ダイオキシン類の分析には煩雑な手順を要するため、簡易的におおよその濃度を把握する目的で簡易迅速測定法の開発がなされている。環境省では、底質のダイオキシン類の汚染監視調査において簡易分析法の適用を認め、また、生物検定法を用いたダイオキシン類の簡易分析法について検討を開始する等簡易測定技術に大きな期待が高まっている。

現在、ダイオキシン類を生物検定法で測定するには、酵素免疫測定方法（以下、「ELISA」と記載する）が提案されている。例えば、ビオチン化ダイオキシン誘導体を標識体とするダイオキシン類の免疫測定法（特許文献 1）、抗原抗体反応を用いて環境汚染物質に対する抗体を、アルコール類、ニトリル類等の溶媒の存在下で選別し、該抗原抗体反応妨害物質耐性抗体を含有する免疫学的分析用キット（特許文献 2）等が知られている。しかしながら、検出感度が、従来の高分解能ガスクロマトグラフ質量分析法では検出限界は 0

10

20

30

40

50

.01pgであるが、ELISAではこのような高感度の検出限界を有する測定方法は知られていない。また、ELISAに供する試料は、試料中に存在するダイオキシン類を有機溶媒によるソックスレーを用いて抽出し、次いで、該抽出液を硫酸処理、シリカゲルカラムクロマトグラフ操作、活性炭カラムクロマトグラフ操作によってクリーンアップし、その処理液を窒素気流下で乾固させ、メタノールやジメチルスホキシド等の極性溶媒に転溶するのが一般的である。そのため、ELISAに使用されてきたポリクローナル抗体やモノクローナル抗体は、メタノールやジメチルスホキシド等の溶媒中でダイオキシン類と結合反応性を有しなければならないという制約がある。

【0004】

多様な物質中に含まれる可能性のある環境汚染物質である有機塩素系化合物、特にダイオキシン類の濃度は極微量であり、その測定には高い感度と精度が要求される。母乳、血液等の生体試料では可能な限り少量の試料での測定が好ましく、少量の試料を用いた有機塩素系化合物、特にダイオキシン類の高感度測定法の開発が望まれている。

【特許文献1】特開2001-226371号公報

【特許文献2】特開2003-38173号公報

【非特許文献1】JIS K0311

【非特許文献2】JIS K0312

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

したがって、本発明の目的は少量の試料で高感度に有機塩素系化合物、特にダイオキシン類が簡便に検出定量できる免疫学的測定方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者は、従来のELISAに供する溶媒として使用されてきたメタノールやジメチルスホキシドの代わりに種々の溶媒の存在下でダイオキシン類と抗ダイオキシン類抗体を反応させることにより検出感度の改善を試み鋭意検討した結果、溶媒としてホルムアミド類を使用すると、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体を用いたELISAにおいて、従来の高分解能ガスクロマトグラフ質量分析法に匹敵する感度を発現し、高感度で少量の試料で簡便にダイオキシン類が検出定量できることを見出し、本発明を完成した。

【0007】

すなわち、本発明は抗原抗体反応をホルムアミド類の存在下に行うことを特徴とする有機塩素系化合物の免疫学的測定方法を提供するものである。

【発明の効果】

【0008】

本発明の免疫学的測定方法は、ダイオキシン類等の有機塩素系化合物を少量の試料で高感度に簡便に検出定量することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明の免疫学的測定方法の検出対象である有機塩素系化合物としては、アルドリン、クロルデン、DDT等の有機塩素農薬、ダイオキシン類、ポリ塩化ビフェニル類等が挙げられるが、ダイオキシン類が最も好ましい。従って、以下に有機塩素系化合物のうちダイオキシン類を用いて、本発明を説明する。

【0010】

ダイオキシン類は、ポリクロロジベンゾダイオキシン(PCDD)、ポリクロロジベンゾフラン(PCDF)及びコプラナーポリクロロビフェニル(Co-PCB)を包含する物質群であって、具体的には、2,3,7,8-四塩化ジベンゾ-p-ジオキシン(2,3,7,8-TeCDD)、1,2,3,7,8-五塩化ジベンゾ-p-ジオキシン、1,2,3,4,7,8-六塩化ジベンゾ-p-ジオキシン、1,2,3,6,7,8-六塩化ジベンゾ-p-ジオキシン、1,2,3,7,8,9-六塩化ジベンゾ-p-ジオキシン、1,2,3,4,6,7,8-七塩化ジベンゾ-p-ジオキシン、1,2,3,4,6,7,8,9-八塩化ジベンゾ-p-ジオ

10

20

30

40

50

キシンのジベンゾ-p-ジオキシン；2,3,7,8 - 四塩化ジベンゾフラン、1,2,3,7,8 - 五塩化ジベンゾフラン、2,3,4,7,8 - 五塩化ジベンゾフラン（2,3,4,7,8-PeCDF）、1,2,3,4,7,8 - 六塩化ジベンゾフラン、1,2,3,6,7,8 - 六塩化ジベンゾフラン、1,2,3,7,8,9 - 六塩化ジベンゾフラン、2,3,4,6,7,8 - 六塩化ジベンゾフラン、1,2,3,4,6,7,8 - 七塩化ジベンゾフラン、1,2,3,4,7,8,9 - 六塩化ジベンゾフラン、1,2,3,4,6,7,8,9 - 八塩化ジベンゾフラン等のジベンゾフラン；3,3',4,4' - 四塩化ビフェニル、3,3',4,4',5 - 五塩化ビフェニル、3,3',4,4',5,5' - 六塩化ビフェニル等のビフェニル等が挙げられる。

【0011】

本発明の免疫学的測定方法は、抗原抗体反応をホルムアミド類の存在下に行う以外は、特に限定されず、通常のELISAを含む免疫学的測定手段に従えばよい。

10

【0012】

本発明で使用するホルムアミド類としては、ホルムアミド、ジメチルホルムアミド、アリルホルムアミド、N,N'-ジメチルアセトアミド等が挙げられ、特にホルムアミドが好ましい。

【0013】

ダイオキシン類と抗ダイオキシン類抗体を含む反応液中のホルムアミド類濃度は、10～70容量%、更に20～50容量%であるのが好ましい。

【0014】

抗原抗体反応の条件は特に制限はなく、免疫学的測定方法で通常に用いられている反応条件で行うことができる。例えば、2～50℃、好ましくは20～40℃で、0.1～48時間、好ましくは0.5～3時間反応させるのが好ましい。

20

【0015】

反応を調節するための緩衝剤としては、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、酢酸緩衝液、炭酸緩衝液等が挙げられる。

【0016】

試料としては、ダイオキシン類を含む可能性のある試料であればよく、例えば、ヒト及び動物の組織、血液、尿、骨髓液、唾液、分泌液等の生体試料、河川、海水、排水、土壌、底質、大気、排ガス、灰等の環境試料等の環境汚染物質を含有する試料が挙げられる。

【0017】

これらの試料は、そのまま用いてもよいが、土壌等の場合には有機溶媒によるソックスレーを用いて抽出し、次いで該抽出液を硫酸処理、各種クロマトグラフ操作でクリーンアップし、ホルムアルデヒド類に溶解して用いるのが好ましい。また、血液の場合には、有機溶媒等で脂肪を抽出し、次いで該抽出液をアルカリ分解し、各種クロマトグラフ操作でクリーンアップし、ホルムアルデヒド類に溶解して用いるのが好ましい。

30

【0018】

免疫学的反応の形態としては、例えば、試料溶液、抗ダイオキシン類抗体及びホルムアルデヒド類を混合し反応させ、定量する方法が挙げられるが、ELISAが特に好ましい。反応にあたっては、試料をホルムアルデヒド類に溶解し、しかる後に抗ダイオキシン類抗体と反応させる方法が好ましい。

【0019】

本発明の方法によるダイオキシン類測定のためのELISAとしては、直接競合法と間接競合法がある。直接競合法は、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体をプレート上に固相化し、試料中の被測定物質と酵素標識抗原を競合的に結合させる方法であり、間接競合法は、試料類似物質をプレート上に固相化し、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体と試料中の被測定物質を添加して抗体に対して固相化抗原と液相抗原の間に競合反応させた後、酵素標識抗体等の二次抗体を加える方法である。本発明に係るELISAの一例として、後述する実施例に記載の高感度ELISAを挙げることができる。

40

【0020】

標識抗原としては、酵素標識抗原、放射性同位体標識抗原等が使用されるが、酵素標識抗原を使用するのが検出感度の点で好ましい。酵素標識抗原の酵素としては、ペルオキシ

50

ダーゼ、 β ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、リゾチーム、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、リボヌクレアーゼ等が挙げられ、ペルオキシダーゼ、 β ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等が好ましい。

【0021】

本発明に利用される抗ダイオキシン類抗体は、測定対象であるダイオキシン類に特異的に反応するものであれば、特に制限はなく、各種公知の抗体又はそれらに準じて製造した抗体であることができる。該抗体にはポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体が包含される。当該抗体は測定対象とするダイオキシン類に応じて適時選択することができる。とくに、毒性係数の高い2,3,7,8-TeCDDや、毒性等価量と強い相関のある2,3,4,7,8-PeCDFと反応する抗体が好ましいがこれに限定されるものではない。当該抗体は、公知の方法（Toxicology, 45, 229-243(1987); J. Agric. Food Chem., 46, 2407-2416(1998); Anal. chem., 70, 1092-1099(1998)）に従い取得することができる。

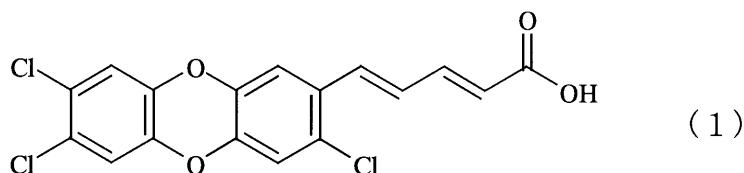
10

【0022】

例えば、免疫抗原としては、下記式（1）で表される化合物を適当な高分子化合物に結合させてから用いることができる。

【0023】

【化1】



20

【0024】

使用する高分子化合物としては、カプトガニヘモシアニン（以下、「LPH」と記載する）、ウシ血清アルブミン（以下、「BSA」と記載する）、ウサギ血清アルブミン（以下、「RSA」と記載する）等が好ましい。

【0025】

式（1）で表される化合物と高分子化合物との結合は、例えば、活性化エステル法（J. Agric. Food Chem., 42, 301-309(1994)）又は混合酸無水物法（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。得られた免疫抗原を使用して、慣用化された方法によりポリクローナル抗体を作製することができる。

30

例えば、式（1）で表される化合物とLPH結合体をリン酸緩衝液（以下、「PBS」と記載する）に溶解し、Freund完全アジュバント又はFreund不完全アジュバント等の補助剤と混合したものを免疫抗原として動物に免疫することによって行う。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、マウス、ヒツジ、ヤギ、ウサギが好ましく、特にウサギが好ましい。

40

【0026】

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。投与は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。

【0027】

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、所望のポリクローナル抗体を得ることができる。また、モノクローナル抗体についても慣用化された方法により作製することができる。例えば、式（1）で表される化合物とLPH結合体をPBSに溶解し、Freund完全アジュバントの補助剤と混合したものを免疫抗原として静脈内、背部等の皮下や腹腔内に注射して免疫し、脾臓細胞を得る。得られた脾臓細胞と骨髓腫細胞（以

50

下、「ミエローマ」と記載する)とを細胞融合させ、これにより得られたハイブリドーマから所望の抗体を産生するハイブリドーマを選択する。このハイブリドーマを大量培養あるいは動物の腹腔内で増殖させ、この培養液あるいは腹水から分離することにより作製することができる。

【0028】

定量にあたっては、標準物質と抗ダイオキシン類抗体との反応をホルムアルデヒド類の存在下に行い、その測定値と対比することによるのが好ましい。本発明の免疫学的測定方法に使用する標準としては特に限定されないが、2,3,7-トリクロロ-8-メチル-ジベンゾパラダイオキシン(以下、「TMDD」と記載する)又は2,3,7,8-TeCDDを用いてダイオキシン類濃度をTMDD0又は2,3,7,8-TeCDD相当量として測定するのが好ましい。

10

【0029】

本発明の免疫学的測定方法を用いたダイオキシン類の測定に際しては、ダイオキシン類をホルムアミド類に溶解した液を被検試料あるいは標準抗原として含有する測定キットとして利用するのが簡便である。

【実施例】

【0030】

以下、実施例、参考例により本発明をさらに詳細に説明する。しかしこれらの実施例、参考例は非制限的なものであり、本発明の範囲はそれらの例によって限定されるものではない。

【0031】

20

参考例1(免疫用ハプテンの調製)

免疫用ハプテン(5-(3,7,8-トリクロロジベンゾ-p-ジオキン-2-イル)-トランス,トランス-ペンタ-2,4-ジエン酸)の合成

(1) 2,4-ジクロロ-5-ニトロベンズアルデヒドの合成

2,4-ジクロロベンズアルデヒド7g(40mmol)を濃硫酸100mLに溶解し、反応容器を氷水浴で冷却後、硝酸カリウム4.45g(44mmol)を加え、氷水浴で冷却したまま1時間、室温で1時間、更に油浴温65℃にて1時間攪拌した。反応容器を氷水浴で冷却後、攪拌しながら蒸留水100mLを加えると黄色の結晶が生成した。反応容器内の反応混合物を1Lビーカーに投入し、蒸留水を加えて全量を1Lとした後、吸引ろ過により結晶をろ別した。この結晶を蒸留水でよく洗浄した後、真空乾燥し、2,4-ジクロロ-5-ニトロベンズアルデヒドを7.02g(収率80%)得た。

30

【0032】

TLC(プレート:Silica gel 60 F₂₅₄)

R_f=0.5(展開溶媒 n-ヘキサン:酢酸エチル=4:1)

R_f=0.7(展開溶媒 ベンゼン)

¹H-NMR(CDCl₃, 400MHz)

δ(ppm): 7.74(Ar-H, s, 1H), 8.44(Ar-H, s, 1H), 10.41(CHO, s, 1H)

¹³C-NMR(CDCl₃, 100MHz)

δ(ppm): 126.2, 129.5, 131.5, 133.3, 133.8, 141.0, 186.3

【0033】

40

(2) 5-(2,4-ジクロロ-5-ニトロフェニル)-トランス,トランス-2,4-ペンタジエン酸エチルの合成

窒素雰囲気下、水素化ナトリウム(60%油中)0.92g(23mmol)を無水THF40mLに懸濁し、4-ホスホクロトン酸トリエチル4.9mL(5.5g, 22mmol)を室温で滴下した。その後、氷水浴で冷却しながら、20mLの無水THFに溶解した2,4-ジクロロ-5-ニトロベンズアルデヒド4.4g(20mmol)を滴下した。氷水浴を取り除いた後、油浴温85℃にて一晚還流加熱攪拌した。還流加熱攪拌中、無水THFが揮発して減るので、随時無水THFの補充を行った。TLCにより原料の消失を確認後、油浴温40℃にてTHFを減圧留去した。室温まで放冷した後、ジエチルエーテル50mLと蒸留水50mLを加え、激しく攪拌した。次いで、有機層と水層の境界線がはっきりするまで塩化ナトリウムを加えてから、分液ろう斗にて有機層と水層を分

50

離した。分離した有機層にジエチルエーテル100mLを加え、飽和食塩水50mLで3回洗浄した後、無水硫酸マグネシウム上で乾燥し、ロータリーエバポレーターで濃縮した。濃縮残渣をアセトン100mLに溶解し、シリカゲル20gを加え、アセトンを減圧留去した。フラスコ内に残ったシリカゲルから、n-ヘキサン：酢酸エチル=9：1で溶出を行った。溶出液をロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して5-(2,4-ジクロロ-5-ニトロフェニル)-トランス,トランス-2,4-ペンタジエン酸エチル0.40g (収率6.3%)を得た。

【0034】

TLC (プレート：Silica gel 60 F₂₅₄)

Rf=0.5 (展開溶媒 ベンゼン)

Rf=0.6 (展開溶媒 n-ヘキサン：酢酸エチル=4:1)

¹H-NMR (CDCl₃, 400MHz)

δ (ppm) : 1.33(CH₃, t, J=7.2Hz, 3H), 4.25(OCH₂, q, J=7.2Hz, 2H), 6.13(=CH-CO₂, d, J=15.6Hz, 1H), 6.94(-CH=, dd, J=15.6Hz, 11.2Hz, 1H), 7.18(Ar-CH=, d, J=15.6Hz, 1H), 7.46(=CH-, dd, J=15.6Hz, 11.2Hz, 1H), 7.62(Ar-H, s, 1H), 8.17(Ar-H, s, 1H)

¹³C-NMR (CDCl₃, 100MHz)

δ (ppm) : 14.2, 60.7, 123.3, 124.9, 127.2, 131.5, 132.0, 132.8, 134.2, 137.8, 142.6, 146.3, 166.3

【0035】

(3) 4,5-ジクロロカテコールの合成

窒素雰囲気下、カテコール11.01g (100mmol) を無水ジエチルエーテル50mLに溶解後、氷水浴で冷却しながら塩化スルフィニル (SO₂Cl₂) 18mL (30.0g, 220mmol) を1mL/minで滴下した。滴下終了後、室温で一晩攪拌を続けた。氷水浴で冷却しながら飽和食塩水50mLを加えた後、ジエチルエーテル50mLを追加し、分液漏斗で有機層と水層を分離した。有機層は、飽和食塩水50mLで洗浄した後、無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、ロータリーエバポレーターで濃縮した。濃縮残渣を真空乾燥して4,5-ジクロロカテコール17.9g (収率100%)を得た。

【0036】

TLC

Rf=0.2 (プレート RP-18 F₂₅₄S、展開溶媒 水：MeOH=2:3)

Rf=0.5 (プレート Silica gel 60 F₂₅₄、展開溶媒 n-ヘキサン：酢酸エチル=1:1)

¹H-NMR (CDCl₃, 400MHz)

δ (ppm) : 5.56(OH, br, 1H), 6.96(Ar-H, s, 1H)

¹³C-NMR (CDCl₃, 100MHz)

δ (ppm) : 114.3, 116.8, 142.8

【0037】

(4) 5-(3,7,8-トリクロロジベンゾ-p-ジオキシン-2-イル)-トランス,トランス-ペンタ-2,4-ジエン酸エチルの合成

窒素雰囲気下、ジクロロカテコール0.135g (0.754mmol) とカリウム tert-ブトキシド0.173g (1.54mmol) を、無水ジメチルホルムアミド2mLに溶解し、更に、18-クラウン-6 0.409g (1.55mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。2mLの無水ジメチルホルムアミドに溶解した5-(2,4-ジクロロ-5-ニトロフェニル)-トランス,トランス-2,4-ペンタジエン酸エチル0.147g (0.464mmol) を室温にて滴下した後、室温で1時間、油浴温120℃で30分、更に油浴温140℃で30分攪拌した。放冷後、蒸留水30mLを加えた。反応混合物をセライトろ過し、ろ別された沈殿を蒸留水20mLで洗浄し、次いで、酢酸エチル50mLで溶出を行った。酢酸エチル溶出液を無水硫酸ナトリウム上で乾燥後、ロータリーエバポレーターで濃縮した。濃縮残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、5-(3,7,8-トリクロロジベンゾ-p-ジオキシン-2-イル)-トランス,トランス-ペンタ-2,4-ジエン酸エチル0.048g (収率25%)を得た。

【0038】

10

20

30

40

50

TLC (プレート: Silica gel 60 F₂₅₄)

R_f = 0.66 (展開溶媒 n-ヘキサン:酢酸エチル = 4:1)

¹H-NMR (CDCl₃, 400MHz)

δ (ppm): 1.32(CH₃, t, J=7.2Hz, 3H), 4.23(OCH₂, q, J=7.2Hz, 2H), 6.00(=CH-CO₂, d, J=15.6Hz, 1H), 6.70(-CH=, dd, J=15.6Hz, 11.2Hz, 1H), 6.85(Ar-H, s, 1H), 6.92(Ar-H, s, 1H), 6.93(Ar-H, s, 1H), 7.05(Ar-H, s, 1H), 7.09(Ar-CH=, d, J=15.6Hz, 1H), 7.41 (=CH-, dd, J=15.6Hz, 11.2Hz, 1H)

¹³C-NMR(CDCl₃, 100MHz)

δ (ppm): 14.3, 60.5, 113.6, 117.6, 117.9, 117.9, 122.7, 127.0, 127.3, 128.2, 128.8, 128.9, 130.2, 134.1, 140.1, 140.4, 141.6, 143.8, 166.7

10

【0039】

(5) 5-(3,7,8-トリクロロジベンゾ-p-ジオキシシ-2-イル)-トランス,トランス-ペンタ-2,4-ジエン酸の合成

5-(3,7,8-トリクロロジベンゾ-p-ジオキシシ-2-イル)-トランス,トランス-ペンタ-2,4-ジエン酸エチル 44.1mg (0.107mmol) を、2-メトキシエタノール 1mL に溶解した。別途、水酸化カリウム 0.2g を蒸留水 1mL に溶解し、その 70 μL を前述の溶液に添加し、油浴温 80℃ で 1 時間攪拌した。放冷後、1mol/L 塩酸 1mL を加え、生成した沈殿を吸引ろ過によりろ別した。ろ別した沈殿を蒸留水 10mL で洗浄した後、1,4-ジオキサンで溶出した。1,4-ジオキサン溶出液を無水硫酸ナトリウム上で乾燥し、ロータリーエバポレーターで濃縮して反応混合物 40.3mg を得た。この反応混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、5-(3,7,8-トリクロロジベンゾ-p-ジオキシシ-2-イル)-トランス,トランス-ペンタ-2,4-ジエン酸 7.0mg (収率 17%) を得た。

20

【0040】

TLC (プレート: Silica gel 60 F₂₅₄)

R_f = 0.1 (展開溶媒 n-ヘキサン:酢酸エチル = 4:1)

R_f = 0.6 (展開溶媒 酢酸エチル)

¹H-NMR(C₄D₈O₂, 400MHz)

δ (ppm): 5.99(d, J=15.6Hz, 1H), 6.91(dd, J=15.6Hz, 11.2Hz, 1H), 7.08(s, 1H), 7.16(s, 1H), 7.18(d, J=15.6Hz, 1H), 7.20(s, 1H), 7.3(s, 1H), 7.46(dd, J=15.6, 11.2Hz, 1H), 10.39(br, 1H)

30

¹³C-NMR(C₄D₈O₂, 100MHz)

δ (ppm): 114.4, 118.2, 118.5, 118.6, 123.4, 127.2, 127.4, 129.0, 129.7, 131.2, 134.2, 141.1, 141.3, 141.5, 142.5, 145.0, 167.3

【0041】

参考例 2 (免疫用ハプテンとカプトガニヘモシアニン (LPH) との結合)

(1) 0.2M ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) の調製

ホウ酸 (H₃BO₃) 0.618g (10mmol) と塩化ナトリウム (NaCl) 0.1461g (2.5mmol) を蒸留水 50mL に溶解した (溶液 I)。四ホウ酸ナトリウム 10水和物 (Na₂B₄O₇ · 10H₂O) 0.953g (2.5mmol) を蒸留水 50mL に溶解した (溶液 II)。溶液 I 28mL と溶液 II 12mL を混合し、0.2mol/L ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) を調製した。

40

【0042】

(2) 結合体の合成

参考例 1 で調製した免疫用ハプテン 7mg (18 μmol) を、無水 1,4-ジオキサン 2mL に溶解した後、室温にてトリ n-ブチルアミン 12 μL (約 50 μmol) を加え、30 分攪拌した。次いで、クロロギ酸イソブチル 6.5 μL (約 50 μmol) を加え、蓋をして 30 分攪拌した。別途、LPH 30mg (SIGMA 社製) を、0.2mol/L ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) 30mL に溶解した後、室温にて 1,4-ジオキサン 1.3mL を加えた。この LPH 溶液に室温にて前述の免疫用ハプテン溶液を加えた後、4℃ にて一晩攪拌した。室温に戻した後、反応液をセロハン透析膜内に移し、少量の 70% エタノールで洗い込み、蒸留水 2L で 5 回透析を行った。透析を終了した反応液をポリプロピレン製容器に移し、凍結乾燥 (減圧乾燥) した。容器に蓋をし、凍結乾燥後の粉末 (

50

結合体)を均一に混合し、免疫用ハプテン-LPH結合体(=免疫原)を得た。得られた結合体は0.2mol/Lホウ酸緩衝液(pH 8.0)に1mg/mLの濃度で溶解してUVスペクトルを測定し、同濃度の結合前LPHのUVスペクトルと比較して結合の確認を行った。本結合体は-20℃で保管した。

【0043】

参考例3(ポリクローナル抗体の取得)

参考例2で得た免疫抗原を200μg/mLになるよう滅菌済み生理食塩水に懸濁させた。これにフロイント完全アジュバント(Sigma社製)を等容量混合し、乳化させた。ウサギ(ニュージーランド白色種、3~3.5kg、メス)7羽にそれぞれ免疫原-アジュバント混合液を1.0mL(免疫原100μg分)皮下免疫した。おおよそ50μL/箇所、1羽当たり10~20箇所に免疫した。ウサギを識別するため、No.1~7とした。

10

二次免疫は一次免疫の30日後に実施した。フロイント不完全アジュバント(Sigma社製)を使用し、免疫原100μg/匹を免疫した。その他は一次免疫と同様に実施した。追加免疫10日後に2mLの血液を評価用としてウサギの耳より採取した。得られた血液は遠心し、上清を採取して抗血清を得、-80℃にて凍結保存した。これを用いて抗体性能試験を実施した。追加免疫及び評価用採血は30日おきに抗体価が上がらなくなるまで(合計4~5回)実施した。抗体価の上昇が認められなくなったウサギについては、前回免疫日から数えて30日後に追加免疫を実施し、その10日後に25~30mLの血液を部分採血した。得られた血液は遠心し、上清を採取して抗血清を得、-80℃にて凍結保存した。部分採血した日から20日後、再び部分採血を実施した。2回目の部分採血日から20日後に追加免疫を実施し、その10日後に全採血を行った。得られた血液は遠心し、上清を採取して抗血清を得、-80℃にて凍結保存した。

20

【0044】

参考例4(固相化ハプテンの調製)

7,8-ジクロロ-[1,4]ベンゾジオキシノ[2,3-b]ピリジン-3-カルボン酸)の合成

(1) 6-ヒドロキシ-5-ニトロニコチン酸の合成

6-ヒドロキシニコチン酸10g(71.9mmol)に氷水浴で冷却しながら、発煙硝酸(d 1.50~1.52)80mLを加え1時間攪拌した。この間に反応容器上に減圧蒸留頭を装着した。水浴に切り替えて更に1時間攪拌、油浴温45℃にて更に4時間攪拌した。次いで、油浴温50℃にて硝酸を減圧蒸留して取り除いた。次に、反応容器内の減圧蒸留残査に蒸留水120mLを加え、吸引ろ過により結晶をろ別した。ろ紙上の結晶を蒸留水100mLで洗浄し、ろ別した結晶に蒸留水120mLを加え、結晶が溶解しきるまで還流加熱攪拌した。室温まで放冷後、結晶のろ別・洗浄を繰り返した。次に、ろ別した結晶を真空乾燥した後、NMR測定により結晶が6-ヒドロキシ-5-ニトロニコチン酸であることを確認した。

30

【0045】

¹H-NMR(DMSO-d₆, 400MHz)

δ(ppm): 3.52(OH & NH, br, 1H) 8.38(Ar-H, d, J=2.4Hz, 1H), 8.66(Ar-H, d, J=2.4Hz, 1H), 13.33(COOH, s, 1H)

¹³C-NMR(DMSO-d₆, 100MHz)

δ(ppm): 108.0, 137.2, 138.6, 146.1, 154.4, 164.1

40

【0046】

(2) 6-クロロ-5-ニトロニコチン酸メチルの合成

6-ヒドロキシ-5-ニトロニコチン酸1.84g(10mmol)と五塩化リン6g(28.8mmol)に、塩化ホスホリル10mL(約107mmol)を加え、窒素雰囲気下、油浴温100℃にて2時間攪拌した。次いで、油浴温を40℃までクールダウンし、過剰の塩化ホスホリルを減圧蒸留により取り除いた。その後、窒素雰囲気下、氷水浴で冷却し、減圧蒸留残査に無水メタノール20mLを蒸留水80mLを加えて吸引ろ過により結晶をろ別した。次いで、ろ紙上の結晶を蒸留水でよく洗浄した。ろ別した結晶を乾燥後、トルエンに溶解し、シリカゲルカラムに通した。次いで、トルエン溶液をロータリーエバポレーターを用いて濃縮し、濃縮残査をn-ヘキサン:トルエン=4:1から再結晶した。次に、結晶を真空乾燥し、NMR測定により結晶が6-ク

50

ロロ-5-ニトロニコチン酸メチルであることを確認した。

【0047】

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz)

δ (ppm): 4.04(CH_3 , d, $J=8\text{Hz}$, 3H), 8.78(Ar-H, t, $J=16\text{Hz}$, 1H), 9.18(Ar-H, t, $J=16\text{Hz}$, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100MHz)

δ (ppm): 53.4, 126.0, 135.0, 147.1, 152.9, 152.9, 162.9

【0048】

(3) 7,8-ジクロロ-[1,4]ベンゾジオキシノ[2,3-b]ピリジン-3-カルボン酸メチルの合成

窒素雰囲気下、カリウム tert-ブトキシド0.37g (3.3mmol) を無水ジメチルホルムアミド4mLに懸濁した。無水ジメチルホルムアミド3mLに溶解したジクロロカテコール0.282g (1.58mmol) を、室温にて前工程の懸濁液に滴下した。次に、18-クラウン-6 0.872g (3.3mmol) を無水ジメチルホルムアミド5mLに溶解した後、前工程の懸濁液に加え1時間攪拌した。次に、6-クロロ-5-ニトロニコチン酸メチル0.325g (1.5mmol) を無水ジメチルホルムアミド30mLに溶解した後、室温にて前工程の懸濁液に滴下した。室温で30分、油浴温120℃にて2時間攪拌した後、室温まで放冷した。次に、氷水浴で冷却しながら蒸留水100mLを加え、分液ろう斗に移して、ジエチルエーテル50mLで抽出した。集めた抽出液を蒸留水30mLで洗浄し、無水硫酸マグネシウム上で乾燥し、ロータリーエバポレーターで濃縮した。次に、濃縮残渣をアセトンに溶解し、シリカゲル1gを加え、ロータリーエバポレーターを用いてアセトン除去した。次に、前工程で反応混合物が擦り込まれたシリカゲルを少量のn-ヘキサン：酢酸エチル=95：5に懸濁し、シリカゲルカラムにアプライした後、フラクションに分けて回収した。次に、TLC (Silica gel 60 F_{254}) で $R_f=0.4$ (n-ヘキサン：酢酸エチル=4：1) のUVスポットを持つフラクションを集めてロータリーエバポレーターで濃縮後、真空乾燥した。NMR測定により濃縮残渣が7,8-ジクロロ-[1,4]ベンゾジオキシノ[2,3-b]ピリジン-3-カルボン酸メチルであることを確認した。

【0049】

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz)

δ (ppm): 3.94(CH_3 , s, 3H), 7.03(Ar-H, s, 1H), 7.10(Ar-H, s, 1H), 7.75(Ar-H, d, $J=1.6\text{Hz}$, 1H), 8.50(Ar-H, d, $J=1.6\text{Hz}$, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100MHz)

δ (ppm): 52.6, 117.9, 118.6, 124.5, 125.1, 127.7, 140.2, 144.5, 151.4, 164.3

【0050】

(4) 7,8-ジクロロ-[1,4]ベンゾジオキシノ[2,3-b]ピリジン-3-カルボン酸の合成

7,8-ジクロロ-[1,4]ベンゾジオキシノ[2,3-b]ピリジン-3-カルボン酸メチル7.9mg (25.3 μmol) を、1,4-ジオキサン0.5mLに溶解し、蒸留水180 μL と1mol/L水酸化ナトリウム水溶液60 μL (60 μmol) を加えて攪拌した。次いで、湯浴温60℃で1時間攪拌し、室温まで放冷後、蒸留水1mLを加えて攪拌した。更に、1mol/L塩酸水溶液を1mL (1mmol) 加えて、吸引ろ過により沈殿をろ別した。次に、前工程の沈殿をアセトン10mLに懸濁し、シリカゲルカラムにアプライし、1,4-ジオキサン20mLを流した。次に1,4-ジオキサン溶出液をロータリーエバポレーターで濃縮後、真空乾燥した。NMR測定により、濃縮残渣が7,8-ジクロロ-[1,4]ベンゾジオキシノ[2,3-b]ピリジン-3-カルボン酸であることを確認した。

【0051】

$^1\text{H-NMR}$ (1,4-dioxane- d_8 , 400MHz)

δ (ppm): 7.20(Ar-H, s, 1H), 7.34(Ar-H, s, 1H), 7.74(Ar-H, s, 1H), 8.42(Ar-H, s, 1H), 10.76(COOH , s, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (1,4-dioxane- d_8 , 100MHz)

δ (ppm): 118.0, 119.0, 124.8, 127.6, 141.0, 144.8, 152.2, 165.0

【0052】

参考例5 (固相化ハプテンとウシ血清アルブミン (BSA) との結合)

10mLねじ口試験管に参考例4で調製した固相化ハプテン5.5mg (18.5 μmol) を無水1,4-

ジオキサン1mLに溶解し、トリn-ブチルアミン12 μ L (約50 μ mol)を加え、20分以上攪拌後、更にクロロギ酸イソブチル6.5 μ L (約50 μ mol)を加え、20分以上攪拌した。次に、BSA30.8mg (SIGMA社製 約0.46 μ mol)を、0.2mol/Lホウ酸緩衝液 (pH 8)に溶解し、1,4-ジオキサン1.3mLを加えた後、前工程で得られた溶液を滴下した。充分混和後、蓋をして4℃にて一晩攪拌した。室温に戻した後、反応液をセロハン透析膜内に移し、少量の70%エタノールで洗い込み、エタノール250mLで3回透析した。更に蒸留水2Lで5回透析した。透析を終了した反応液をポリプロピレン製15mL容器に移し、凍結乾燥した。凍結乾燥後の粉末 (結合体)を均一に混合し、固相化ハプテン-BSA結合体を得た。

【0053】

参考例6 (ハプテン固相化プレートの作製)

10

参考例5で調製した固相化ハプテン-BSA結合体の粉末10mgを秤量し、リン酸緩衝液 (pH 7.2)1mLに溶解し、10mg/mL溶液を調製した。次いで、10mg/mL溶液の10 μ Lを固相化用50mmol/L炭酸緩衝液 (pH 9.6)990 μ Lで希釈し、100 μ g/mL溶液を調製した。更に、100 μ g/mL溶液を固相化用50mmol/L炭酸緩衝液 (pH 9.6)で希釈し、96wellマイクロタイタープレートに100 μ Lづつ分注し、4℃で一晩静置した。静置後、上清を除去し、洗浄液 (0.02%Tween20を含むPBS)で5回洗浄後、ブロッキング液 (0.2%BSAを含むPBS)を300 μ L/wellで添加した。次いで、室温で2時間静置した後、上清を除去し、洗浄液 (0.02%Tween20を含むPBS)で5回洗浄後、PBSを加え、ハプテン固相化プレートとした。

【0054】

実施例1

20

(1) 標準液の調製

ホルムアミド (以下、「FA溶液」という)を希釈液とし、TMDDをそれぞれ、40000,4000,400,40,4,0.4,0.04,0pg/mLの濃度に希釈調製し標準液とした。また対照としてジメチルスルホキシド (以下、「DMSO溶液」と記載する)を希釈液とし、TMDDをそれぞれ、40000,4000,400,40,4,0.4,0.04,0pg/mLの濃度に希釈調製し比較対照標準液とした。

【0055】

(2) 試料 (測定用) の調製

風乾し、2mm目のふるいを通させた土壌10g、底質10g及び2試料の燃え殻1gについて、それぞれトルエンを用いたソックスレー抽出を実施し、トルエン抽出液を得た。次に、得られたそれぞれのトルエン抽出液の1/2を分取し、JIS K0311、JIS K0312に従い前処理を行い高分解能ガスクロマトグラフ質量分析法 (HRGC/HRMS) の値を測定した。またそれぞれの残りの1/2をロータリーエバポレーターで約1mLに濃縮し、予め200mLのヘキサンで洗浄した多層カラム (スベルコ社製)に負荷した。次いで、ヘキサン150mLで溶出した後ロータリーエバポレーターで濃縮した。かかる手順により得られた試料溶液をそれぞれ2等分し、窒素気流下で蒸発乾固した後、FA溶液又はDMSO溶液60 μ Lに溶解し、免疫測定に供した。

30

【0056】

(3) 抗ダイオキシン類抗体の調製

参考例3で得られたウサギNo.1~7のうち力価の確認されたNo.1及びNo.2の抗血清を、それぞれ0.3%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝液で3500倍に希釈して使用した。

40

【0057】

(4) 二次抗体液の調製

ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体 (シグマ社製)を、0.05%Tween20,10%ウシ胎児血清を含むリン酸緩衝液で3000倍に希釈して使用した。

【0058】

(5) 発色液の調製

ジメチルホルムアミド20mLに3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン (シグマ社製) 0.2g溶解したものを原液とし、使用時に0.006%過酸化水素を含む酢酸緩衝液 (pH5.5)で原液を101倍希釈して使用した。

【0059】

50

(6) 免疫測定 (標準液)

ハブテン固相化プレートの測定に使用するウェル全てにリン酸緩衝液25 μ Lを分注した後、FA溶液で調製した各濃度の標準液25 μ L及びFA溶液25 μ L、FA溶液で調製した実試料25 μ L及びFA溶液25 μ L、DMSO溶液で調製した各濃度の標準液25 μ L、DMSO溶液で調製した実試料25 μ Lを各ウェルに加えた。さらに抗ダイオキシン類抗体50 μ Lを使用するウェル全てに加えて室温で90分間反応させた。反応終了後各ウェルの液を除き洗浄液で5回洗浄した。各ウェルに二次抗体液100 μ Lを分注し、室温で60分間反応させた。反応終了後各ウェルの液を除き洗浄液で5回洗浄した。各ウェルに発色液100 μ Lを分注し室温で20分間反応させた。反応終了後1mol/L硫酸を各ウェルに50 μ L加えて反応を停止した。

マイクロプレートリーダーを用いて波長450nmにて各ウェルの吸光度を測定した。

得られた各標準液の吸光度から下記式により阻害率を求め、ウサギNo1及びウサギNo2の抗血清について、図1と図2の標準曲線を得た。

【0060】

【数1】

$$\text{阻害率 (\%)} = \left[\left(\text{標準液0濃度の吸光度} - \text{各ウェルの吸光度} \right) / \left(\text{標準液0濃度の吸光度} - \text{最小吸光度 (バックグラウンド値)} \right) \right] \times 100$$

【0061】

図1の標準曲線から得られた50%阻害率を示すTMDD濃度はDMSO溶液で調製したものが5.40pg/wellに対してFA溶液で調製したものは0.21pg/wellであり、FA溶液で調製したものは約25倍高い感度が得られた。また、その測定範囲は阻害率10%から90%に設定した場合、DMSO溶液で調製したものが0.71~40.50pg/wellに対してFA溶液で希釈したものは0.01~4.60pg/wellであった。

また、図2の標準曲線から得られた50%阻害率を示すTMDD濃度はDMSO溶液で調製したものが8.25pg/wellに対してFA溶液で調製したものは0.27pg/wellであり、FA溶液で調製したものは約30倍高い感度が得られた。また、その測定範囲は阻害率10%から90%に設定した場合、DMSO溶液で調製したものが1.31~51.81pg/wellに対してFA溶液で希釈したものは0.01~33.44pg/wellであった。

【0062】

(7) 免疫測定

試料 (測定用) については、ウサギNo.1から得られた抗血清を用いて測定した。試料 (測定用) についても同様にして阻害率を求め、さらに標準曲線よりダイオキシン濃度をTMDD相当量として求めた結果を表1、表2に示す。

【0063】

【表1】

阻害率 (%)

試料	FA溶液	DMSO溶液
土壌	48	4
底質	71	8
燃え殻 No.1	84	28
NO.2	73	9

【0064】

【表 2】

試料	FA溶液	DMSO溶液	FA溶液	DMSO溶液	HRGC/HRMS
	pg/well		pg/g		pgTEQ/g
土壌	0.19	－	0.18	－	0.88
底質	0.68	－	0.65	－	2.50
燃え殻No.1	2.55	2.39	24.48	22.94	25.00
No.2	0.85	－	8.16	－	8.45

10

注：－は定量下限以下を示す。

【0065】

燃え殻No.1の測定値より求めた阻害率は、DMSO溶液で28%に対してFA溶液では84%であった。この阻害率を標準液で得られたデータにより換算すると、DMSO溶液で調製したものが2.39pg/wellに対して、FA溶液で調製したものは2.55pg/wellであった。同様に、土壌、底質及び燃え殻No.2の測定値より求めた阻害率はDMSO溶液で4%、8%及び9%に対してFA溶液では48%、71%及び73%となった。すなわち、DMSO溶液で調製したものは測定範囲外となったがFA溶液で調製したものは0.19pg/well、0.68pg/well及び0.85pg/wellであり、ホルムアルデヒド溶液中で抗原抗体反応を行った場合、感度が顕著に向上することがわかった。

20

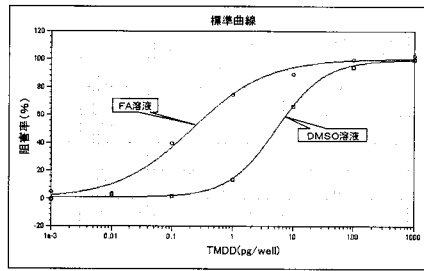
【図面の簡単な説明】

【0066】

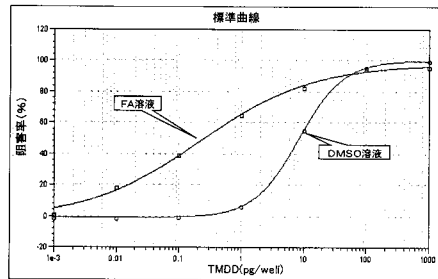
【図1】実施例1のウサギNo1の抗血清による免疫測定で得られた標準曲線を示す。

【図2】実施例1のウサギNo2の抗血清による免疫測定で得られた標準曲線を示す。

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

- (74)代理人 100117156
弁理士 村田 正樹
- (74)代理人 100111028
弁理士 山本 博人
- (72)発明者 石塚 昌宏
埼玉県幸手市権現堂 1 1 3 4-2 コスモ石油株式会社中央研究所内
- (72)発明者 上田 康信
埼玉県幸手市権現堂 1 1 3 4-2 コスモ石油株式会社中央研究所内
- (72)発明者 宗像 浩
埼玉県幸手市権現堂 1 1 3 4-2 コスモ石油株式会社中央研究所内
- (72)発明者 栖川 能裕
東京都港区芝浦一丁目 1 番 1 号 コスモ石油株式会社内

【要約の続き】

专利名称(译)	有机氯化物的免疫学测量方法		
公开(公告)号	JP2005257351A	公开(公告)日	2005-09-22
申请号	JP2004066750	申请日	2004-03-10
[标]申请(专利权)人(译)	克斯莫石油株式会社		
申请(专利权)人(译)	科斯莫石油有限公司		
[标]发明人	石塚昌宏 上田康信 宗像浩 栖川能裕		
发明人	石塚 昌宏 上田 康信 宗像 浩 栖川 能裕		
IPC分类号	G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.S		
代理人(译)	村田正树		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种免疫学测量方法，能够简单地检测和测定有机氯化物，如二恶英，高灵敏度，少量样品。ŽSOLUTION：在有机氯化物，特别是二恶英的免疫学测量方法中，抗原 - 抗体反应在甲酰胺存在下进行。 Ž

