

(12) 公開特許公報 (A) (11) 特許出願公開番号

特開2002 - 145825

(P2002 - 145825A)

(43)公開日 平成14年5月22日(2002.5.22)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-ム-ト* (参考)
C 0 7 C 59/68		C 0 7 C 59/68	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/44		C 0 7 K 16/44	4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 5
15/02		G 0 1 N 33/00	D 4 H 0 0 6
C 1 2 P 21/08		33/53	S 4 H 0 4 5
審査請求 未請求 請求項の数 60 L (全 11数) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2000 - 341268(P2000 - 341268)	(71)出願人	000206901 大塚化学株式会社 大阪府大阪市中央区大手通3丁目2番27号
(22)出願日	平成12年11月9日(2000.11.9)	(72)発明者	大川 秀郎 兵庫県神戸市北区柏尾台14 - 14
		(72)発明者	中田 昌伸 大阪府豊中市東寺内町17 - 7 - 406
		(72)発明者	高井 幹夫 兵庫県神戸市灘区篠原南町1 - 1 - 2 - 201
		(74)代理人	100065215 弁理士 三枝 英二 (外8名)

最終頁に続く

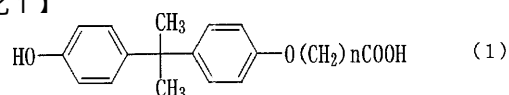
(54)【発明の名称】 ビスフェノールA化合物、免疫学的反応体、ハイブリドーマ及びビスフェノールAの測定方法

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、河川等の環境水中等におけるビスフェノールAの濃度の簡便、迅速な測定法に好適に使用され得る新規ビスフェノールA化合物を提供することを課題とする。

【解決手段】 本発明のビスフェノールA化合物は、一般式

【化 1】

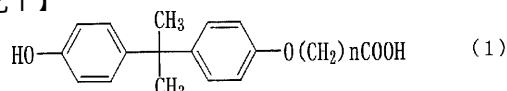


[式中、nは3～9の整数を示す。] で表される。また、本発明によれば、ビスフェノールA化合物と担体又は標識物質との結合体、ビスフェノールA等に反応性を有する免疫学的反応体等が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 一般式 (1)

【化 1】



[式中、nは3～9の整数を示す。]で表されるビスフェノールA化合物。

【請求項 2】 請求項 1 に記載のビスフェノールA化合物と担体又は標識物質との結合体。

【請求項 3】 ビスフェノールA及び請求項 1 に記載のビスフェノールA化合物に反応性を示す免疫学的反応体。

【請求項 4】 免疫学的反応体がモノクローナル抗体である請求項 3 に記載の免疫学的反応体。

【請求項 5】 請求項 3 に記載の免疫学的反応体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 6】 請求項 3 又は請求項 4 に記載の免疫学的反応体を用いることを特徴とするビスフェノールAの免疫学的測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

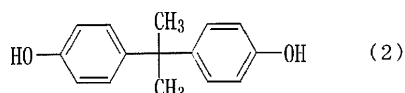
【発明の属する技術分野】本発明は、ビスフェノールA化合物、免疫学的反応体、ハイブリドーマ及びビスフェノールAの測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】ビスフェノールA、すなわち 2, 2' - ビス(4' - オキシフェニル)プロパンは、式(2)

【0003】

【化 2】



で表される化学構造を有する化合物である。

【0004】ビスフェノールAは、ポリカーボネート及びエポキシ樹脂の原料モノマーとして広く用いられている。ビスフェノールAは、内分泌攪乱作用を有し、いわゆる環境ホルモン物質であると指摘されている。

【0005】ビスフェノールAは、工場廃水から、原料として使用されたプラスチック製品から、又は産業廃棄物置き場から、水環境中に流出し、環境汚染が予想されることから、そのモニタリングが重要な課題となっている。

【0006】従来、ビスフェノールAを始めとする化学物質の分析には、機器分析法が用いられ、例えば、水中濃度のモニタリングの場合には、試料から分析すべき化学物質を抽出・精製した後に、ガスクロマトグラフィーを用いた測定が行われてきた。これらの方法は、精度の点では問題はないものの、操作が煩雑で測定に時間がかかるため、環境中のビスフェノールAを、より迅速、簡

便かつ経済的にモニタリングすることのできる、新しい測定法の開発が求められていた。

【0007】一方、免疫学的測定法は、抗原抗体反応を利用して抗原の測定を行うもので、測定精度が優れているばかりでなく、迅速、簡便かつ経済的な測定法である。従来、免疫学的測定法は、臨床診断の分野で患者の病態の解析法の一つとして、大きな役割を担ってきたが、環境中に残留する農薬等の物質の測定にも、次第に適用されるようになってきた。しかし、ビスフェノールAへの適用は、その必要性が高かったのにも拘わらず、従来は全く行われておらず、適当な抗体はもとより、抗体を調製するためのハプテンも得られていなかった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】従来、ビスフェノールAの測定に当たっては、主に、試料からビスフェノールAを抽出し、精製後、ガスクロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーを用いて分析している。これらの方法は、その感度や精度の点で優れているものの、試料の調製が煩雑で多大の手間と時間を必要とし、分析に熟練を要すること、並びに、測定装置や設備費等に高額な費用を必要とする。特に環境中のビスフェノールAの分析では短時間の内に結果を出す必要があり、精度面以外にも簡便性、迅速性、かつ経済性を備えた新しい測定法が要望されている。

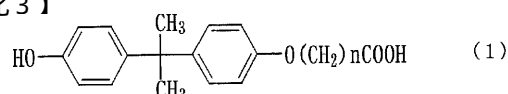
【0009】そこで、本発明者らは、土壌や、河川等の環境水中等におけるビスフェノールAの濃度の簡便、迅速な測定法として、ビスフェノールAに対して反応性を有する抗体を用いる免疫化学的検出法の適用を検討してきた。その結果、下記一般式(1)で表されるビスフェノールA化合物を合成し、これをハプテンとして用いて得られるビスフェノールA化合物と担体との結合体が、ビスフェノールAに反応する免疫学的反応体の調製に適していることを見出した。また、このようにして調製された免疫学的反応体、例えばモノクローナル抗体がビスフェノールAと特異的に反応し、これらの免疫学的反応体を用いる免疫学的測定法により、ビスフェノールAを正確に測定することができることを見出した。本発明は、斯かる知見に基づき完成されたものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、一般式(1)

【0011】

【化 3】



[式中、nは3～9の整数を示す。]で表されるビスフェノールA化合物が提供される。

【0012】また、本発明によれば、前記一般式(1)で表されるビスフェノールA化合物と担体又は標識物質

との結合体が提供される。

【0013】また、本発明によれば、ビスフェノールA及び前記一般式(1)で表されるビスフェノールA化合物に反応性を示す免疫学的反応体、例えばモノクローナル抗体が提供される。

【0014】また、本発明によれば、ビスフェノールA及び前記一般式(1)で表されるビスフェノールA化合物に反応性を示す免疫学的反応体、例えばモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが提供される。

【0015】また、本発明によれば、前記免疫学的反応体を用いることを特徴とするビスフェノールAの免疫学的測定方法が提供される。

【0016】本発明方法によれば、ビスフェノールA分析の大幅な簡略化と測定時間の短縮が可能となり、多数の検体を迅速、簡便かつ経済的に測定できるようになった。

【0017】

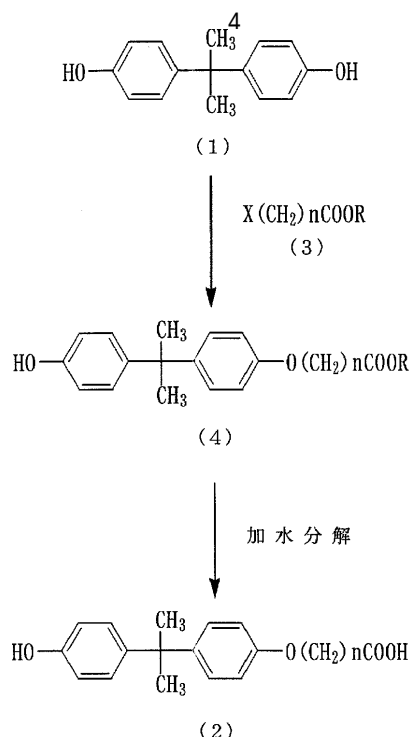
【発明の実施の形態】以下、本発明のビスフェノールA化合物及びその合成方法、ビスフェノールA化合物と担体又は標識物質との結合体及びその調製方法、ポリクローナル抗体の調製方法、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの分離及びハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体の調製方法、これらの抗体フラグメントの調製方法、そして免疫学的分析測定の際に説明する。

【0018】本発明の一般式(1)で表されるビスフェノールA化合物は、文献未記載の新規化合物である。一般式(1)において、nは3～9の整数、好ましくは3～5の整数である。

【0019】一般式(1)で表される本発明化合物は、公知の方法に従って製造することができる。例えば、一般式(1)で表される本発明化合物は、下記反応式に示す方法に従い、製造される。

【0020】

【化4】



[式中、Rはカルボキシル保護基を示す。Xはハロゲン原子を示す。nは前記に同じ。]

即ち、一般式(1)で表される本発明化合物は、式(2)で表されるビスフェノールA(2,2'-ビス(4'-オキシフェニル)プロパン)と一般式(3)で表されるハロゲン化物とを反応させて、一般式(4)で表されるビスフェノールA化合物に導き、次いでこの化合物(4)からカルボキシル保護基を除去することによって、一般式(1)で表される本発明化合物が製造される。

【0021】前記一般式(3)において、カルボキシル保護基としては従来公知のものでよく、特に限定されるものではないが、例えばメチル基、エチル基、tert-ブチル基、ベンジル基、tert-ブチルジメチルシリル基、トリメチルシリル基等を例示できる。

【0022】式(2)で表されるビスフェノールAと一般式(3)で表されるハロゲン化物との反応は、当該分野で利用可能な公知の方法を適宜利用することができ、斯くして一般式(4)で表されるビスフェノールA化合物に容易に導くことができる。

【0023】例えば、ジメチルホルムアミド等の不活性溶媒中で水素化ナトリウム等の塩基の存在下、式(2)で表されるビスフェノールAと一般式(3)で表されるハロゲン化物とを、室温で反応させることにより、一般式(4)で表されるビスフェノールA化合物が容易に製造できる。

【0024】カルボキシル保護基Rの除去方法としては、例えばアルカリもしくは酸の存在下で一般式(4)の化合物を加水分解する方法等が挙げられる。ここで塩基性触媒としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム

等のアルカリ金属水酸化物、カリウム tert - ブトキシド等の有機金属塩基等を例示できる。また、酸性触媒としては、塩酸、硫酸等の鉱酸、酢酸、トリフルオロ酢酸等のカルボン酸、p - トルエンスルホン酸等のスルホン酸等を例示できる。この反応において使用される溶媒としては、例えばメタノール、エタノール等のアルコール類、テトラヒドロフラン、ジオキサン等のエーテル類、ジメチルスルホキシド等のスルホキシド類、ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素類、1, 2 - ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類、水又はこれらの混合溶媒等が挙げられる。該反応は通常 0 からその使用する溶媒の沸点温度までの温度範囲で、好ましくは室温温度で進行し、一般に 0.5 ~ 24 時間程度で完結する。

【0025】また、カルボキシル保護基 R がベンジル基である場合、その除去は加水素分解によっても行うことができる。

【0026】斯くして本発明のビスフェノール A 化合物が製造される。

【0027】上記各反応で得られる目的化合物は、各々通常分離手段により反応系内より分離され、更に精製することができる。この分離及び精製手段としては、例えば蒸留法、再結晶法、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、親和クロマトグラフィー、プレパラティブ薄層クロマトグラフィー、溶媒抽出法等を採用できる。

【0028】前記反応において中間原料として用いられる一般式 (3) のハロゲン化物は、商業的に入手可能なアミノ酸を公知の方法に従って反応することにより容易に製造することができる。

【0029】また、式 (2) で表されるビスフェノール A は、商業的に容易に入手可能な化合物である。

【0030】前記一般式 (1) で表されるビスフェノール A 化合物は、ビスフェノール A と特異的に反応する免疫学的反応体 (例えば、抗体、より具体的にはポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体、又はビスフェノール A と結合可能な部位を含むそれらのフラグメント、あるいは抗血清等) の調製においてハプテンとして用いることができ、更に各種の免疫学的測定方法の開発に必要な標識抗原の調製に用いることができる。ここで「ハプテン」とは、抗体との結合能を有しているものの、それ単独では免疫原性を有さず、担体と結合することによって免疫原性を発現する物質を意味する。従って、一般にハプテンは、担体と結合するための官能基を有する。

【0031】前記一般式 (1) で表される本発明のビスフェノール A 化合物と担体又は標識物質との結合体の調製、抗血清及びポリクローナル抗体の調製、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの分離及びハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体の調製の方法は、いずれも常法、例えば、続生化学実験講座 (日本生化学

会編) 又は免疫生化学研究法 (日本生化学会編) に記載の方法で行うことができる。

【0032】前記一般式 (1) で表されるビスフェノール A 化合物との結合体を調製する際には、従来から、一般に用いられている公知の担体を用いることができる。ここで、担体とは、ハプテンと結合 (コンジュゲート化) してハプテンに免疫原性を付与する物質を意味する。担体としては、例えば生体高分子化合物、例えば、分子量が約 1 万以上、好ましくは約 4 万 ~ 100 万のタンパク質 (例えば、血清アルブミン、免疫グロブリン、オボアルブミン、ポリリジン、キーホールリンペットヘモシアニン等)、又は多糖類 (例えばデキストラン、アミロース、アミロペクチン等)、あるいは細胞 (例えば、哺乳類の赤血球、BCG 菌等) 等を挙げることができる。

【0033】一方、前記一般式 (1) で表されるビスフェノール A 化合物は、前記担体と結合することのできる官能基を有している。この官能基は、前記担体と結合することのできるものであればよく、用いる担体に応じて適宜選択することができる。

【0034】例えば、担体として高分子化合物であるタンパク質を用いる場合は、そのアミノ基と結合することのできる官能基として、例えばカルボキシル基、アルデヒド基、アミノ基、エポキシ基等を、またタンパク質のチオール基と結合することのできる官能基として、例えばチオール基、マレイミド基等を挙げることができる。また多糖類の場合には、水酸基と結合することのできる官能基として、例えばカルボキシル基、アルデヒド基、エポキシ基等を挙げることができる。

【0035】本発明のビスフェノール A 化合物と担体との結合は、従来公知の方法を用いて行うことができる。例えば、担体として高分子化合物であるタンパク質を用いる場合には、混合酸無水物法、活性エステル法、カルボジイミド法等の従来公知の結合方法によって本発明のビスフェノール A 化合物とタンパク質との結合体を調製することができる。

【0036】また、本発明においては、前記一般式 (1) で表されるビスフェノール A 化合物を標識物質と結合させることができる。標識物質としては、公知の標識を用いることができ、例えば、酵素 (例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等)、発光物質 (例えば、ルミノール、アクリジニウム誘導体等)、蛍光物質 (例えば、フルオレセイン、ユーロピウムキレート等) を挙げることができる。斯かる標識物質は、上記と同様の操作によって本発明のビスフェノール A 化合物と結合させることができる。得られた結合体は、測定対象となるビスフェノール A との競合反応に用いることができる。

【0037】本発明の免疫学的反応体は、例えば次のようにして調製される。

【0038】例えば、本発明による抗血清又はポリクローナル抗体の調製には、前記一般式(1)で表されるビスフェノールA化合物と担体との結合体を免疫原に用いることができる。免疫は、哺乳動物や鳥類(例えば、マウス、ウサギ、又は鶏等)へ、通常の方法、例えば、免疫原溶液を等量のフロイントの完全アジュバント又は不完全アジュバントと乳化混合したものを接種(初回免疫)し、以後2~4週間の間隔で数回免疫することによって行うことができる。その後、免疫した動物から血液を採取し、ポリクローナル抗体を含む抗血清を調製する。その後、DEAEイオン交換クロマトグラフィー又はプロテインGアフィニティークロマトグラフィー等により、抗血清からポリクローナル抗体を精製することができる。

【0039】また、前記一般式(1)で表されるビスフェノールA化合物と担体との結合体を免疫原に用い、本発明によるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを分離することができる。

【0040】例えば、最終免疫して数日後の動物(例えば、マウス)から脾臓を無菌的に取り出し、ステンレススチールメッシュ等で押しつぶして脾臓細胞を調製し、細胞融合工程に用いる。細胞融合の他の一方の親細胞であるミエローマ細胞(骨髄腫細胞)は、各種の公知の細胞株、例えば、P3・NS-1/1・Ag4.1[Eu r . J . Immunol . , 5 ; 511-517 (1975)]、SP2/0-Ag14[Nature , 276 ; 269-270 (1978)]、P3-X63-Ag8.653[J . Immunol . , 123 ; 1548-1550 (1979)]等を使用することができる。

【0041】細胞融合は、通常の方法、例えば、公知の融合促進剤を含む培地[例えば、市販の細胞融合用ポリエチレングリコール(分子量1500; ベーリンガー・マンハイム社製)]中で、脾臓細胞とミエローマ細胞とをよく混合することによって行うことができ、細胞の混合比率も常法に従って、例えば、マウスの脾臓細胞に対してミエローマ細胞を約1/5~1/10程度の割合で行うことができる。融合後、選択用培地(例えば、HAT培地)を用いて、ハイブリドーマのみを増殖させる。それらの内、培養上清中に目的のモノクローナル抗体を分泌しているハイブリドーマは、例えば、培養上清のビスフェノールAとの反応性を酵素結合免疫測定法(ELISA)でスクリーニングすることによって確認し、選択することができる。また、これらのハイブリドーマは、通常、細胞クローニング法、例えば、限界希釈法を用いて分離でき、公知の培地で継代培養し、液体室素中で容易に長期間保存することができる。

【0042】また、ハイブリドーマ(モノクローナル抗体産生細胞)の産生するモノクローナル抗体は、これを培養することにより、容易に調製することができる。特

に、イン・ピトロの培養では、例えば、5%二酸化炭素及び37条件下で培養に適した任意の培地を用いて培養することができ、好適にはダルベコ培地に10%ウシ胎児血清(以下「FBS」と略す)を含む培地(以下、「ダルベコ/10%FBS培地」と略す)を用いることができる。またイン・ピボの培養では、用いたミエローマと同種の動物、例えば、マウスの腹腔中で培養するのが好ましい。これらの培養上清又は腹水を各々モノクローナル抗体溶液として用いることができる。

【0043】また、抗血清や培養上清、あるいは腹水を出発材料として、抗体を精製することもできる。抗体の精製には、タンパク質の精製に一般的な方法、例えば硫酸塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、プロテインAもしくはプロテインG結合ポリマー等を用いるアフィニティークロマトグラフィー、又は透析等の方法を適宜組み合わせて用いることができる。

【0044】本発明のビスフェノールAの免疫学的測定方法によれば、前記の免疫学的反応体(ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体、あるいは抗血清)を用いて実施するので、ビスフェノールAを正確に分析することができる。すなわち、本発明の免疫学的測定方法によって、ビスフェノールAの存在の検出、半定量的測定又は定量的測定を行うことができる。本発明による免疫学的測定方法は、ビスフェノールAに特異的に反応する免疫学的反応体を用いることを除けば、それ以外の点では従来公知の免疫学的測定方法、例えば、酵素免疫測定方法、蛍光免疫測定方法又は放射性免疫測定方法等を適用することができる。

【0045】本発明方法に従えば、環境水中等に存在している可能性のあるビスフェノールAを測定することができる。被検試料は、ビスフェノールAを含有する試料である限り特に限定されるものではない。

【0046】本発明による免疫学的測定方法を、例えば、通常抗原標識法と呼ばれる方法、すなわち、上記抗体もしくは抗体フラグメントを固相化した後、ビスフェノールA化合物と標識物質との結合体である標識化ビスフェノールA化合物(標準品)と、試料中の検査対象化合物ビスフェノールAとを競合阻害反応させる方法等に適用することができる。ここでは、本発明による免疫学的測定方法の内、抗原標識法について以下に説明する。

【0047】本発明方法は、例えば、

(1)ビスフェノールAと特異的に反応する免疫学的反応体、特に抗体もしくは抗体フラグメントを固相化する(以下、「固相化抗体」と略す)工程;

(2)被検試料が水性試料の場合には、その被検試料を濾紙等で濾過し、また被検試料が土壌等の場合には、被検試料中に含まれていることのあるビスフェノールAを抽出することのできる有機溶媒で被検試料を抽出処理し、検体を調製する工程;

(3) 前記固相化抗体と検体と標識化ビスフェノールA化合物とを接触させ、反応させる工程；

(4) 固相化抗体に結合した標識化ビスフェノールA化合物と、結合していない標識化ビスフェノールA化合物とを分離する工程；

(5) 前記工程(4)で分離した、いずれか一方、好ましくは固相化抗体と結合した標識化ビスフェノールA化合物に由来する信号を測定する工程からなる。

【0048】本発明方法を実施する場合には、前記のように、標識化ビスフェノールA化合物を用いてビスフェノールAの確認又は定量を行うことができる。ビスフェノールA化合物の標識には、公知の標識物、例えば、放射性同位体(例えば、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^3H 等)、酵素(例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等)、ビタミン(例えば、ビオチン等)、蛍光物質(例えば、FITC等)、又は化学発光物質(例えば、アクリジニウム等)等を用いることができる。

【0049】また、本発明方法では、固相化抗体と標識化ビスフェノールA化合物との反応が終了した後で、固相化抗体に結合しなかった標識化ビスフェノールA化合物を分離する。分離は、例えば、濾過、遠心処理又は緩衝液による洗浄によって行うことができる。

【0050】分離後、例えば固相化抗体と結合した標識化ビスフェノールA化合物からの信号を測定することができる。信号を測定する際には、反応系を信号測定に適した条件に変えるのが好ましい。例えば、標識物として、蛍光又は化学発光物質を用いた場合には、消光が起こらない条件で信号を検出する。前記の免疫学的測定法においては、適当な対照液(例えば、固相化抗体とビスフェノールA化合物との結合体)をコントロールとして使用することができる。

【0051】

【実施例】以下、実施例を掲げて本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0052】実施例1

4 - { 4 - [1 - (4 - ヒドロキシフェニル) - 1 - メチルエチル] フェノキシ } 酪酸の合成
ビスフェノールA (2) (4.6 g、20ミリモル) を N,N - ジメチルホルムアミド (DMF) 50 ml に溶解して、0.8 g (20ミリモル) の水素化ナトリウム (油性、60%) を加えた。室温で30分攪拌後、2.72 g (20ミリモル) の4 - クロロ酪酸メチル (3) のジメチルホルムアミド溶液20 ml を滴下した。室温で5時間攪拌後、反応液をジエチルエーテル/水で分配抽出し、ジエチルエーテル層を無水硫酸マグネシウムで脱水、濾過、濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n - ヘキサン : 酢酸エチル = 4 : 1 ~ 1 : 1) 粗精製した。

【0053】上記で得られた4 - { 4 - [1 - (4 - ヒ

ドロキシフェニル) - 1 - メチルエチル] フェノキシ } 酪酸メチル (4) の粗精製物をエタノール/水 (10 / 1) の混合溶液100 ml に溶解して、10 g の水酸化ナトリウムを添加後、5時間攪拌した。氷冷しながら塩酸でpHを2に調整し、濃縮後に酢酸エチル/水で分配抽出した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで脱水、濾過、濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n - ヘキサン : 酢酸エチル = 4 : 1 ~ 2 : 1) で精製することにより、白色結晶として0.74 g (通算収率12%) の標題の目的物4 - { 4 - [1 - (4 - ヒドロキシフェニル) - 1 - メチルエチル] フェノキシ } 酪酸を得た。

【0054】実施例2

ビスフェノールA化合物と担体タンパク質との結合体の調製

免疫原としてウシ血清アルブミン (BSA) と本発明のビスフェノールA化合物 (ハプテン) の結合体を混合酸無水物法を用いて作製した。

【0055】上記実施例1で製造した4 - { 4 - [1 - (4 - ヒドロキシフェニル) - 1 - メチルエチル] フェノキシ } 酪酸の7.85 mg を1 ml の無水ジオキサンに溶解し、0.025 μl のN - メチルモルホリンを加えて10 で20分間攪拌し、更に0.01 μl のクロロ蟻酸イソブチルを少しづつ添加し20分間攪拌して、4 - { 4 - [1 - (4 - ヒドロキシフェニル) - 1 - メチルエチル] フェノキシ } 酪酸の混合酸無水物を調製した。一方、16.8 mg のBSAを1 ml の蒸留水に溶解したのち、1 NのNaOHでpH9.5に調整し、さらに10 でジオキサン1.3 ml を滴下した。このBSA溶液に、1 NのNaOH溶液でpH9に保ちながら先に調製した4 - { 4 - [1 - (4 - ヒドロキシフェニル) - 1 - メチルエチル] フェノキシ } 酪酸の混合酸無水物溶液を徐々に滴下し、4 で4時間攪拌した。反応終了後、4 で一晩蒸留水に対して透析した後、凍結乾燥してフリーザー内に貯蔵した。こうして得られたビスフェノールA化合物とBSAとの結合体を免疫原として使用した。

【0056】また、コーティング抗原として用いるために、4 - { 4 - [1 - (4 - ヒドロキシフェニル) - 1 - メチルエチル] フェノキシ } 酪酸とウサギ血清アルブミン (RSA) との結合体も同様の方法で調製した。

【0057】実施例3

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作成と抗体の作製

実施例2で調製した免疫原を2 mg / ml になるように生理的リン酸緩衝液に溶解し、アジュバントと等量混合した後、Balb / cマウスに100 μl をマウス腹腔内に投与した。その後、2週間毎に追加免疫した。尾血管から採取した血液の血清中の抗体力価が高くなったマウスの脾臓を摘出し、DME M培地 (ダルベコ改変イー

グル培地)を入れたシャーレ内で摘出した脾臓をハサミで傷をつけ、注射筒で培地を脾臓内に注入して細胞を追いつ出した。培地を遠沈管に移し、大きな組織片を沈降させるために5分間静置した。脾臓細胞が浮遊している上清を静かに取り、単細胞の懸濁液を $300 \times g$ 、5分間遠心して細胞を集め、脾臓細胞を調製した。マウスのミエローマ細胞(P3X63Ag8.653)を細胞数の比で5:1(ミエローマ細胞:脾臓細胞)になるように混合し、 $300 \times g$ 、5分間遠心して細胞を集めた。上清を除去し、遠心管をはじいて沈殿細胞をほぐした後、37℃に暖めておいた50%ポリエチレングリコール(分子量1,500)溶液1mlを60秒かけてゆっくり加え細胞融合を行った。DMEM培地9mlを加えた後、含牛胎児血清DMEM培地40mlを添加した。遠心によって集められた細胞を細胞数が 5×10^5 個/mlになるようにHAT培地を加えた。細胞懸濁液を96穴プラスチックプレートに $250 \mu\text{l}$ /ウェルの量を分注して、37℃にて5%二酸化炭素の気相中でインキュベーションした。1週間後、ウェル中の培地の半量をHAT培地で置換して、10日から14日間培養した。培養液中の抗体の活性をELISA法で調べ、目的とする抗体を産生しているウェルの細胞について、96穴のプラスチックプレートで、HAT培地を用い、限界希釈法によりハイブリドーマのクローニングを行った。クローニングした結果、最終的に抗ビスフェノールA抗体を産生している安定なハイブリドーマ5株を得た。これらの株をそれぞれBBA-2187、BBA-2617、BBE-4280、BKE-3430及びBKE-4265と名付け、このハイブリドーマ株をDMEMに10%牛胎児血清を含む培地で培養した。培養液の遠心上清をモノクローナル抗体溶液とし、それぞれ「モノクローナル抗体BBA-2187」(以下単に「抗体BBA-2187」という)、「モノクローナル抗体BBA-2617」(以下単に「抗体BBA-2617」という)、「モノクローナル抗体BBE-4280」(以下単に「抗体BBE-4280」という)、「モノクローナル抗体BKE-3430」(以下単に「抗体BKE-3430」という)及び「モノクローナル抗体BKE-4265」(以下単に「抗体BKE-4265」という)とした。調製したモノクローナル抗体溶液はPBSで希釈して抗原固相化し、競合間接ELISA法によりビスフェノールAの反応性を調べた。

【0058】以下にモノクローナル抗体とビスフェノールAとの反応性の測定例を示す。

【0059】実施例4

o-フェニレンジアミン発色溶液を用いたELISA(標準ELISA)によるビスフェノールAの測定

1) 96穴マイクロプレートにビスフェノールAとRSAとの結合体(100 ng/ml)を $100 \mu\text{l}$ /ウェルの量を加えて4℃で一晩インキュベーションしてプレ

ートに吸着させた。洗浄緩衝液で5回洗浄後、3%スキムミルク溶液又は4倍希釈のブロックエース(Block-Ace、大日本製薬(株)製)溶液の $250 \mu\text{l}$ /ウェル量を加え、25℃で1時間インキュベーションした後、プレートを洗浄した。2)モノクローナル抗体をPBSで1,500倍に希釈した溶液とビスフェノールA溶液の各々 $50 \mu\text{l}$ をウェルに加え、1時間インキュベーションした後、プレートを洗浄した。3)西洋ワサビペルオキシダーゼを結合した抗マウスIgGヤギ抗体(第二抗体)をPBSで3,000倍に希釈し、 $100 \mu\text{l}$ /ウェルを加え、25℃で1時間インキュベーションした後、プレートを洗浄した。4)0.2%のo-フェニレンジアミン発色溶液(100 mM リン酸クエン酸緩衝液(PH5.0)、0.003%過酸化水素水)の $200 \mu\text{l}$ /ウェルを加え、25℃で10分間インキュベーションした後、4N硫酸 $50 \mu\text{l}$ /ウェルを加えて酵素反応を止め、492nm及び630nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

【0060】抗ビスフェノールA抗体を用いた場合のELISA法によるビスフェノールAとRSAとの結合体の濃度は $100 \mu\text{g/ml}$ を用い、抗体の2,000倍希釈溶液とメタノールに溶解したビスフェノールA標準ストック溶液を 0.1 ng/ml から 500 ng/ml の濃度になるようにPBSで段階的に希釈した溶液をウェルに加え、第二抗体を3,000倍に希釈したものをを用いることにより作成したビスフェノールAの標準阻害曲線を図1に示す。阻害率は次式より算出して示した。

【0061】阻害率(%)=(標準試料の吸光度/コントロールの吸光度) $\times 100$

測定の結果、抗体BBA-2187を用いたELISAによるビスフェノールAの測定可能範囲は $0.1 \sim 1 \text{ ng/ml}$ であり、50%阻害を示す値(IC₅₀値)は 0.24 ng/ml であった。

【0062】実施例5

ルミノール発色溶液を用いたLC-ELISAによるビスフェノールAの測定

1) 96穴マイクロプレート(黒色プレート)にビスフェノールAとRSAとの結合体(100 ng/ml)を $100 \mu\text{l}$ /ウェルの量を加えて4℃で一晩インキュベーションしてプレートに吸着させた。洗浄緩衝液で5回洗浄後、4倍希釈のブロックエース(Block-Ace、大日本製薬(株)製)溶液の $250 \mu\text{l}$ /ウェル量を加え、25℃で1時間インキュベーションした後、プレートを洗浄した。

2)モノクローナル抗体をPBSで3,000倍に希釈した溶液とビスフェノールA溶液の各々 $50 \mu\text{l}$ をウェルに加え、1時間インキュベーションした後、プレートを洗浄した。

3)西洋ワサビペルオキシダーゼを結合した抗マウスIgGヤギ抗体(第二抗体)をPBSで4,000倍に希

釈し、100 μ l / ウェルを加え、25 で1時間インキュベーションした後、プレート洗浄した。

4) ルミノール発色溶液 E L I S A 基質 P O D (ペーリンガマンハイム社製) の100 μ l / ウェルを加え、25 で10分間インキュベーションした後、化学蛍光リーダー (アトー社: ルミネッセンサー J N R , A B - 2100) で測定した。

【0063】抗ビスフェノールA抗体を用いた場合の L C - E L I S A 法によるコーティング抗原の濃度は100 μ g / ml を用い、抗体の3,000倍希釈溶液とメタノールに溶解したビスフェノールA標準ストック溶液を0.1 ng / ml から3,000 ng / ml の濃度になるように P B S で段階的に希釈した溶液をウェルに加え、第二抗体を4,000倍に希釈したものをを用いることにより作成したビスフェノールAの標準阻害曲線を図2に示す。

【0064】抗体 B B A - 2187 を用いた L C - E L I S A によるビスフェノールAの測定可能範囲は0.053 ~ 1 ng / ml (64 ~ 1000 ppt) であり、50%阻害を示す値 (IC₅₀ 値) は0.23 ng / ml であつた。L C - E L I S A による測定法の感度及び測定可能範囲は、実施例4の標準 E L I S A による測定法の感度及び測定可能範囲と同程度であつた。

【0065】実施例6

アビジン - ビオチン複合体を用いた A B C - E L I S A によるビスフェノールAの測定

1) 96穴マイクロプレート (白色プレート) にビスフェノールAと R S A との結合体 (100 ng / ml) を100 μ l / ウェルの量を加えて4 で一晩インキュベーションしてプレートに吸着させた。洗浄緩衝液で5回洗浄後、4倍希釈のブロックエース (B l o c k - A c e、大日本製薬 (株) 製) 溶液の250 μ l / ウェル量を加え、25 で1時間インキュベーションした後、プレートを洗浄した。

2) モノクローナル抗体を P B S で3,000倍に希釈した溶液とビスフェノールA溶液の各々50 μ l をウェルに加え、1時間インキュベーションした後、プレートを洗浄した。

3) ビオチン化抗マウス I g G ヤギ抗体 (第二抗体) を100 μ l / ウェルを加え、25 で1時間インキュベーションした後、プレートを洗浄した。

4) イムノ ピュア ウルトラ - センシティブ A B C ペルオキシダーゼ ステイニング キット (Immuno P

ure Ultra-Sensitive ABC Peroxidase StainingKit) (ピラス社製) を2,000倍希釈したビオチン結合ペルオキシダーゼ溶液の100 μ l / ウェルを加え、25 で1時間インキュベーションした後、プレートを洗浄した。

5) 実施例4で使用した0.2%のo - フェニレンジアミン発色溶液 (100 mM リン酸クエン酸緩衝液 (P H 5.0)、0.003%過酸化水素水) の200 μ l / ウェルを加え、25 で10分間インキュベーションした後、4 N 硫酸50 μ l / ウェルを加えて酵素反応を止め、492 nm 及び630 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

【0066】抗ビスフェノールA抗体を用いた場合の A B C - E L I S A 法によるコーティング抗原の濃度は100 μ g / ml を用い、抗体の3,000倍希釈溶液とメタノールに溶解したビスフェノールA標準ストック溶液を0.1 ng / ml から3,000 ng / ml の濃度になるように P B S で段階的に希釈した溶液をウェルに加え、第二抗体を2,000倍に希釈したものをを用いることにより作成したビスフェノールAの標準阻害曲線を図3に示す。

【0067】抗体 B B A - 2187 を用いた A B C - E L I S A によるビスフェノールAの測定可能範囲は0.057 ~ 1 ng / ml (64 ~ 1000 ppt) であり、50%阻害を示す値 (IC₅₀ 値) は0.24 ng / ml であつた。A B C - E L I S A による測定法の感度及び測定可能範囲は、実施例4の標準 E L I S A による測定法の感度及び測定可能範囲並びに実施例5の L C - E L I S A による測定法の感度及び測定可能範囲と同程度であつた。

【0068】実施例7

抗体のビスフェノールA構造類似化合物に対する交差反応性

ビスフェノールAと化学構造が類似している化合物について抗体 B B A - 2187 の交差反応性を調べた。交差反応性は試験化合物の IC₅₀ 値を求め、次式より計算した。

【0069】交差反応率 (%) = (ビスフェノールAの IC₅₀ 値 / 試験化合物の IC₅₀ 値) × 100

上記式を用いて交差反応率を算出した結果を表1に示す。

【0070】

【表1】

抗体BBA-2187のビスフェノールA関連化合物
及び構造類似化合物との交叉反応性

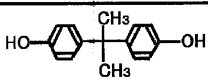
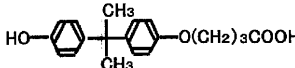
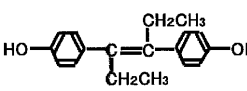
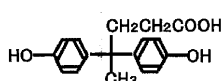
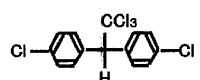
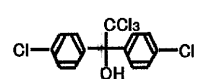
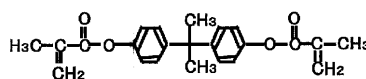
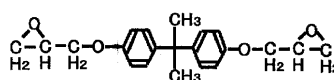
化合物	構造式	抗体BBA-2187	
		IC ₅₀ 値 (ng/ml)	交叉反応性 (%)
ビスフェノールA		0.544	100
ビスフェノールA ハブテン		0.965	56.3
ジエチルステル ベストロール (DES)		390	0.139
ジフェノール酸		>1000	<0.0544
DDT		>1000	<0.0544
ジコホール		>1000	<0.0544
ビスフェノールA ジメタクリレート		>1000	<0.0544
ビスフェノールA ジグリシジル エーテル (BADGE)		>1000	<0.0544

表1から次のことが判る。すなわち、抗体BBA-2187は、試験した化合物のビスフェノールE及びビスフェノールFと僅かに反応したが、他の化合物とは殆ど反応しなかった。この結果より、本抗体は、ビスフェノールAに対して特異性の高い結合様式を示した。

【0071】以上の結果から、次のことが明らかになった。ビスフェノールAと担体蛋白質との結合体をマウスに免疫して得られた脾臓細胞とミエローマ細胞を融合することにより、ビスフェノールAと結合する抗体を産生する融合細胞を選抜した。この細胞を培養した培養上清を抗体として用い、ビスフェノールAを測定するための

ELISA法の最適条件を決定した。このELISA法によって河川水中の低濃度のビスフェノールAをモニタリングするに当たっては、本ELISA法による簡便、迅速な方法が適していることが判明した。

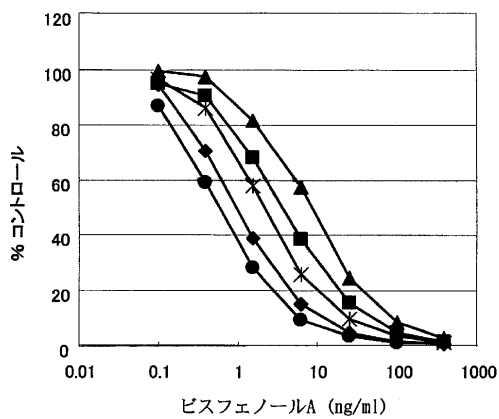
【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、標準ELISA法によるビスフェノールAの標準曲線である。

【図2】図2は、LC-ELISA法によるビスフェノールAの標準曲線である。

【図3】図2は、ABC-ELISA法によるビスフェノールAの標準曲線である。

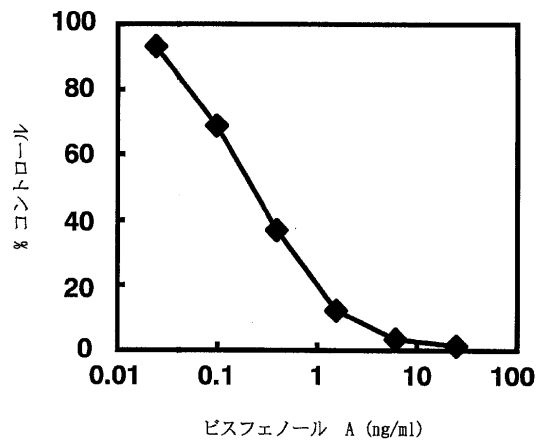
【図1】



調製した5種類の抗体を用いたビスフェノールA標準曲線

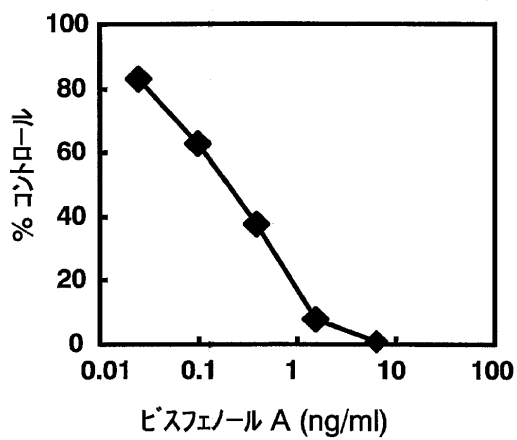
●: 抗体BBA-2187、* : 抗体BBA-2617、▲ : 抗体BBE-4280
◆: 抗体BKE-3430 ■: 抗体BKE-4265

【図2】



抗体BBA-2187を用いたLC-ELISA測定法によるビスフェノール A の標準曲線

【図3】



BBA-2187を用いたABC-ELISA測定法によるビスフェノール A 標準曲線

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷		識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
G 0 1 N	33/00		G 0 1 N 33/577	B
	33/53		C 1 2 R 1:91)	
	33/577		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 森宗 孝介
徳島県鳴門市里浦町里浦字花面615番地
大塚化学株式会社鳴門研究所内

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA53 GA03 GA18 HA15
4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24
DA13
4B065 AA91X AB05 AC14 AC15
BA08 BA24 BB01 BC03 BC07
BD15 BD50 CA25 CA46
4H006 AA01 AA03 AB80 AB99 BJ50
BN30 BP30 BS10
4H045 AA11 AA20 AA30 DA76 EA50
FA72 GA15

专利名称(译)	双酚A化合物，免疫反应物，杂交瘤和测量双酚A的方法		
公开(公告)号	JP2002145825A	公开(公告)日	2002-05-22
申请号	JP2000341268	申请日	2000-11-09
申请(专利权)人(译)	大冢化学株式会社		
[标]发明人	大川秀郎 中田昌伸 高井幹夫 森宗孝介		
发明人	大川 秀郎 中田 昌伸 高井 幹夫 森宗 孝介		
IPC分类号	G01N33/53 C07C59/68 C07K16/44 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/00 G01N33/577		
FI分类号	C07C59/68 C07K16/44 C12P21/08 G01N33/00.D G01N33/53.S G01N33/577.B C12R1/91 C12N5/00.B C12N15/00.C C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/GA03 4B024/GA18 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/AC15 4B065/BA08 4B065/BA24 4B065/BB01 4B065/BC03 4B065/BC07 4B065/BD15 4B065/BD50 4B065/CA25 4B065/CA46 4H006/AA01 4H006/AA03 4H006/AB80 4H006/AB99 4H006/BJ50 4H006/BN30 4H006/BP30 4H006/BS10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA15		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的目的是提供一种新颖的双酚A化合物，其适用于简单快速的方法来测量环境水如河流中双酚A的浓度。本发明的双酚A化合物具有通式：[在公式中，n表示3到9的整数。]表示。本发明还提供了双酚A化合物与载体或标记物质的缀合物，与双酚A具有反应性的免疫反应物等。

