

(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2007-131544**(P2007-131544A)**(43) 公開日 **平成19年5月31日(2007.5.31)**

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)	
C O 7 K 16/44 (2006.01)	C O 7 K 16/44		4 B O 2 4	
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	C	4 B O 6 4	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	B	4 B O 6 5	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	S	4 C O 7 1	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08		4 H O 4 5	
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 20 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願2005-323537 (P2005-323537)

(22) 出願日 平成17年11月8日 (2005.11.8)

(71) 出願人 000155023

株式会社堀場製作所

京都府京都市南区吉祥院宮の東町2番地

(74) 代理人 100092266

弁理士 鈴木 崇生

(74) 代理人 100104422

弁理士 梶崎 弘一

(74) 代理人 100105717

弁理士 尾崎 雄三

(74) 代理人 100104101

弁理士 谷口 俊彦

(74) 代理人 100113147

弁理士 今木 隆雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エマメクチンおよびその類似化合物に対する抗体の製造方法、抗体、ハイブリドーマ、その免疫学的測定方法および測定キット

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 エマメクチンおよびその類似化合物（主としてエマメクチンの代謝生成物）に対して高感度、かつ選択性の高い抗体を作製するための方法、およびエマメクチンおよびその類似化合物に対する抗体、ならびに当該抗体を用いた高感度かつ定量性に優れたエマメクチンおよびその類似化合物の免疫学的測定方法、および測定キットを提供すること。

【解決手段】 上記エマメクチン（16員環マクロライド系殺虫剤）の類似化合物をハプテンとし、当該ハプテンと高分子化合物との複合体を抗原として用いることを用いることを特徴とする。

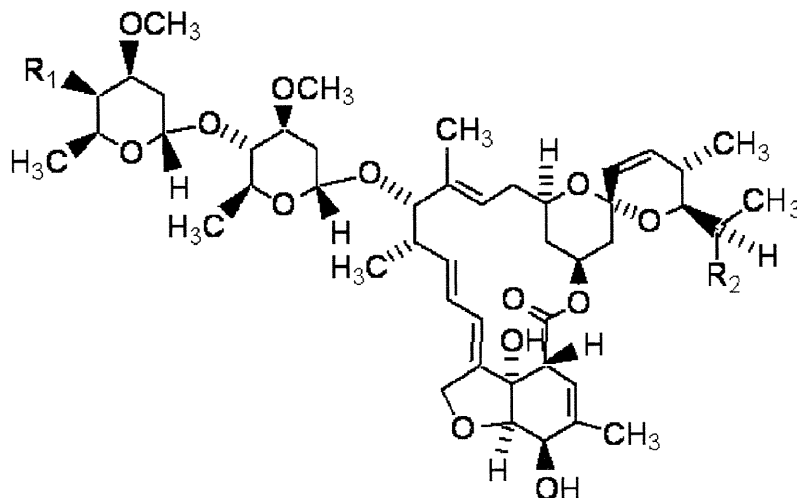
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式 (1) :

【化 1】



10

(式中、 R_1 は NR_3R_4 または OR_3 を、 R_2 はメチル基およびエチル基を、 R_3 は水素原子、 $-CO(CH_2)_nR_5$ または $-(CH_2)_nR_5$ を、 R_4 は水素原子または炭素数 1 から 10 のアルキル基を、 R_5 は水素原子、カルボキシル基、アミノ基、アルデヒド基またはヒドロキシル基を、 n は 0 から 10 の整数を表す。)

で表わされる構造を有する化合物をハプテンとし、当該ハプテンと高分子化合物との複合体を抗原として用いることを特徴とするエマメクチンおよびその類似化合物に対する抗体の製造方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の化合物で、 R_1 が $-N(CH_3)CO(CH_2)_3COOH$ 、 R_2 がメチル基およびエチル基で表される構造を有する化合物をハプテンとし、当該ハプテンと高分子化合物との複合体を抗原として用いることによるエマメクチンおよびその類似化合物に対する抗体の製造方法。

30

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の製造方法にて得られるエマメクチンおよびその類似化合物に対する抗体または抗原と結合可能なそのフラグメント。

【請求項 4】

エマメクチンおよびその類似化合物に対する抗体またはそのフラグメントがポリクローナル抗体またはそのフラグメント、あるいはモノクローナル抗体またはそのフラグメントであることを特徴とする請求項 3 に記載の抗体またはそのフラグメント。

【請求項 5】

請求項 3 または 4 に記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

40

【請求項 6】

ハイブリドーマが EMT2-17H7-2 である請求項 5 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 7】

請求項 3 または 4 に記載の抗体またはそのフラグメントを含んでなるエマメクチンおよびその類似化合物の免疫学的測定方法。

【請求項 8】

請求項 3 または 4 に記載の抗体またはそのフラグメントを含んでなるエマメクチンおよびその類似化合物の測定キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【 0 0 0 1 】

本発明は、エマメクチンおよびその類似化合物に対する抗体の製造方法、抗体、ハイブリドーマ、その免疫学的測定方法および測定キットに関する。

ここで、エマメクチンとは、エマメクチン B 1 a とエマメクチン B 1 b の混合物をいい、エマメクチン B 1 a とは、化学名『 (1 0 E , 1 4 E , 1 6 E , 2 2 Z) - (1 R , 4 S , 5 ' S , 6 S , 6 ' R , 8 R , 1 2 S , 1 3 S , 2 0 R , 2 1 R , 2 4 S) - 6 ' - [(S) - s e c - ブチル] - 2 1 , 2 4 - ヒドロキシ - 5 ' , 1 1 , 1 3 , 2 2 - テトラメチル - 2 - オキソ - 3 , 7 , 1 9 - トリオキサテトラシクロ [1 5 , 6 , 1 , 1 ⁴ , ⁸ , 0 ²⁰ , ²⁴] ペンタコサ - 1 0 , 1 4 , 1 6 , 2 2 - テトラエン - 6 - スピロ - 2 ' - (5 ' , 6 ' - ジヒドロ - 2 ' H - ピラン) - 1 2 - イル 2 , 6 - ジデオキシ - 3 - O - メチル - 4 - O - (2 , 4 , 6 - トリデオキシ - 3 - O - メチル - 4 - メチルアミノ - α - L - リキソ - ヘキソピラノシル) - α - L - アラビノ - ヘキソピラノシド』と表される物質をいい、

10

エマメクチン B 1 b とは、化学名『 (1 0 E , 1 4 E , 1 6 E , 2 2 Z) - (1 R , 4 S , 5 ' S , 6 S , 6 ' R , 8 R , 1 2 S , 1 3 S , 2 0 R , 2 1 R , 2 4 S) - 2 1 , 2 4 - ヒドロキシ - 6 ' - イソプロピル - 5 ' , 1 1 , 1 3 , 2 2 - テトラメチル - 2 - オキソ - 3 , 7 , 1 9 - トリオキサテトラシクロ [1 5 , 6 , 1 , 1 ⁴ , ⁸ , 0 ²⁰ , ²⁴] ペンタコサ - 1 0 , 1 4 , 1 6 , 2 2 - テトラエン - 6 - スピロ - 2 ' - (5 ' , 6 ' - ジヒドロ - 2 ' H - ピラン) - 1 2 - イル 2 , 6 - ジデオキシ - 3 - O - メチル - 4 - O - (2 , 4 , 6 - トリデオキシ - 3 - O - メチル - 4 - メチルアミノ - α - L - リキソ - ヘキソピラノシル) - α - L - アラビノ - ヘキソピラノシド』と表される物質をいう。

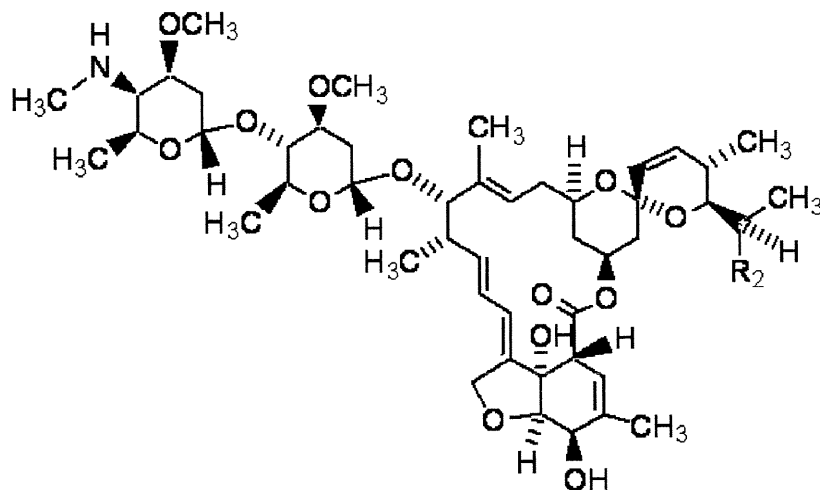
20

【 背景技術 】

【 0 0 0 2 】

エマメクチンは、以下の式 (2) :

【 化 2 】



30

(式中、 R ₂ はメチル基およびエチル基を示す)

40

で表される構造を有する 1 6 員環マクロライド系殺虫剤で、害虫の神経系に作用し速やかに殺虫効果を発揮して食害を抑制する。ミナミキイロアザミウマ、チャノキイロアザミウマ等のアザミウマ目害虫、シンクイムシ類、チャノホソガ、キンモンホソガ、ギンモンハモグリガ、モモハモグリガ、ミカンハモグリガ等の鱗翅目害虫、更にはマメハモグリバエ等の双翅目害虫やハダニ類などの幅広い害虫に低薬量で卓効を示し、既存薬剤に抵抗性を示す害虫に対しても優れた効果を示す作物に対して安全性の高い化合物である。

【 0 0 0 3 】

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農薬等の残留に大きな社会的関心が寄せられている。エマメクチンについては、食品衛生法で食品、添加物等規格基準の残留基準値が、例えば、キャベツ (0 . 1 p p m) 、だい

50

こん類の根(0.1 ppm)、だいこん類の葉(0.1 ppm)、はくさい(0.1 ppm)、ブロッコリー(0.1 ppm)、芽キャベツ(0.1 ppm)、きゅうり(0.1 ppm)、トマト(0.1 ppm)、なす(0.1 ppm)、茶(0.5 ppm)などと定められている。従って、環境や食品に関する安全確保のためには、上記の農作物に含有される、エマメクチンの量を迅速かつ正確に測定することが必要である(非特許文献1参照)。

【0004】

従来、例えば農作物中のエマメクチンの含有量は、代謝生成物についても同時に求める必要のあることから、麦、果実、野菜類等から抽出した後、2通りの方法で処理し、蛍光誘導化の処理を行った後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分析されてきた。即ち、試料をメタノールで抽出、ろ過後、C₁₈ミニカラム、次いでスルホプロピルシリカゲルミニカラム処理を行う。次に処理液を2つに分け、一方は更にNH₂シリカゲルミニカラムで処理後、それぞれ蛍光誘導化し、HPLCで測定する方法が採用されている(非特許文献1参照)。

10

【0005】

近年、多種類の農薬を一括して分析する機器分析による一斉分析法が公定法として認められてきており、一斉分析法は残留農薬分析で大きな位置を占めつつある。しかし、エマメクチンはその複雑な前処理法の故に一斉分析法による分析はできず、単一の分析でも時間がかかることから簡便な分析法の確立が望まれている。

【0006】

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解析法の一つとして大きな役割を担ってきたが、環境負荷化学物質の測定への適用が進んでいる。

20

【0007】

【非特許文献1】「農薬登録保留基準ハンドブック(改正4版)」〔第169～173頁〕(化学工業日報社)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかしながら、上記HPLCで測定する方法は、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のコストを必要とする等の問題点がある。エマメクチ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いる。

30

【0009】

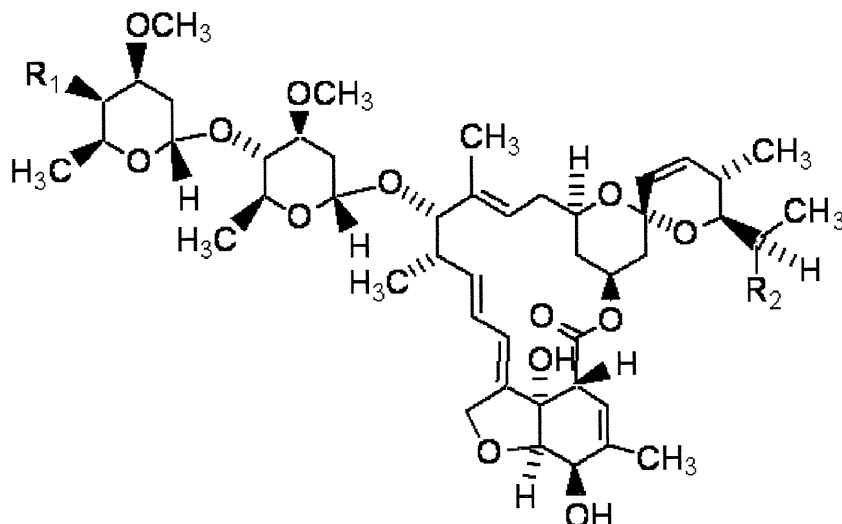
また、免疫学的測定法においても、エマメクチンに対する抗体の作製、それを用いた測定方法についての報告はなく、実用化の要請が強まっている。

【0010】

免疫測定法はその性質上、構造類似化合物に対しても高い反応性を示すことが多い。逆に以下の一般式(3)

40

【化 3】



10

(式中、 R_1 : $-NH_2$ 、 $-NHCHO$ および $-N(CH_3)CHO$ を、 R_2 はメチル基およびエチル基を示す)

で表されるエマメクチンの代謝生成物(以後、 R_1 : $-NH_2$ をアミノ体、 $-NHCHO$ をホルミルアミノ体、 $-N(CH_3)CHO$ をN-メチルホルミルアミノ体と称する)はその化学構造がエマメクチンに非常に類似していることから、エマメクチンの糖鎖の末端部分のアミノ基の部分にリンカーを導入したハプテン由来の抗体を作製した場合、その抗体はエマメクチンのみならずその代謝生成物に対しても高い反応性が期待でき、エマメクチンとその代謝生成物を同時に測定できる可能性が高い。

20

【0011】

本発明の目的は、エマメクチンおよびその類似化合物(主としてエマメクチンの代謝生成物)に対して高感度、かつ選択性の高い抗体を作製するための方法、およびエマメクチンおよびその類似化合物に対する抗体、ならびに当該抗体を用いた高感度かつ定量性に優れたエマメクチンおよびその類似化合物の免疫学的測定方法、および測定キットを提供することにある。

30

【課題を解決するための手段】

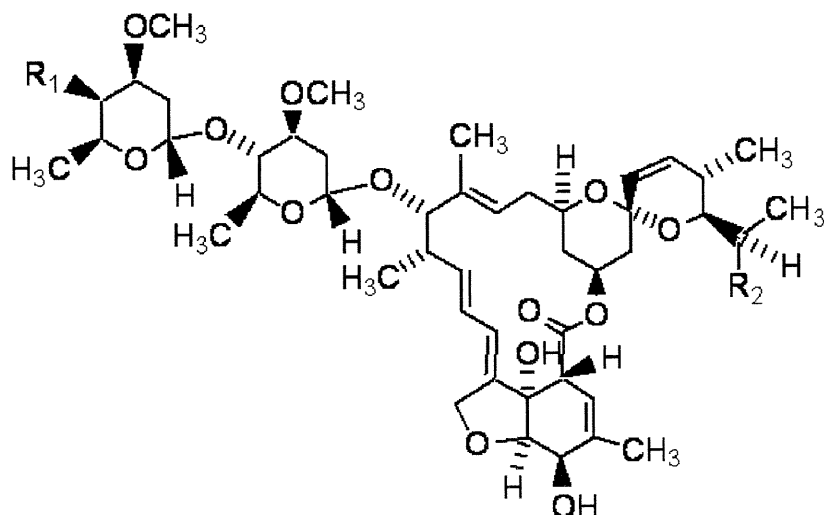
【0012】

本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、以下に示すエマメクチン誘導体をハプテンとして使用することによるエマメクチンおよびその類似化合物の抗体作製方法、抗体、その抗体を産生するハイブリドーマ、その抗体を含んでなるエマメクチンおよびその類似化合物の免疫学的測定方法、および測定キットにより前記目的を達成することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0013】

すなわち、本発明は、下記式(1)：

【化 1】



10

(式中、 R_1 は NR_3R_4 または OR_3 を、 R_2 はメチル基およびエチル基を、 R_3 は水素原子、 $-CO(CH_2)_nR_5$ または $-(CH_2)_nR_5$ を、 R_4 は水素原子または炭素数 1 から 10 のアルキル基を、 R_5 は水素原子、カルボキシル基、アミノ基、アルデヒド基またはヒドロキシル基を、 n は 0 から 10 の整数を表す。)

20

で表わされる構造を有する化合物をハプテンとし、当該ハプテンと高分子化合物との複合体を抗原として用いることによるエマメクチンに対する抗体の製造方法である(請求項 1)。

【0014】

本発明者は、上記化合物(1)をエマメクチンおよびその類似化合物のハプテンとして好適に用いることにより、高感度、かつ選択性の高いエマメクチンおよびその類似化合物に対する抗体の作製が可能であることを案出したものであり、当該抗体を用いた高感度かつ定量性に優れたエマメクチンおよびその類似化合物の免疫学的測定方法および測定キットを提供することができる。

【0015】

30

特に、前記式(1)で表される化合物において、 R_1 が $-N(CH_3)_3COOH$ 、 R_2 がメチルおよびエチルで表される構造を有することが好ましい(請求項 2)。

【0016】

こうした構成を有することによって、エマメクチンおよびその類似化合物に対する抗体製造のハプテンとして特に優れた効果を奏することができる。

【0017】

本発明は、上記製造方法にて得られるエマメクチンおよびその類似化合物に対する抗体または抗原と結合可能なそのフラグメントである(請求項 3)。

【0018】

40

本発明においては、上記化合物をハプテンとして得られた抗体と、上記ハプテンと高分子化合物との複合体を抗原として用いることにより、動物においてエマメクチンおよびその類似化合物に対する免疫応答を良好に惹起することができ、特異的かつ高感度なエマメクチンおよびその類似化合物に対する抗体またはそのフラグメントを得ることができる。

【0019】

本発明は、上記抗体またはそのフラグメントであって、エマメクチンおよびその類似化合物に対する抗体またはそのフラグメントが、ポリクローナル抗体またはそのフラグメントあるいはモノクローナル抗体またはそのフラグメントであることを特徴とする(請求項 4)。

【0020】

50

一般に抗体には、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体が包含され、本発明においては、いずれの抗体をも利用できる。また、本発明に係る抗原 - 抗体反応においては、さらに、こうした抗体のみならず、F a bフラグメントやF (a b ') 2フラグメントなどのように抗原結合性を有する抗体の一部も包含される。

【 0 0 2 1 】

本発明は、上記のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマである（請求項5）。

【 0 0 2 2 】

本発明に係るハイブリドーマによって、前記モノクローナル抗体を安定して産生することができるとともに、当該ハイブリドーマを培養または由来の動物の腹腔内に投与し腹水を作らせることにより、大量のモノクローナル抗体を製造することができる。

10

【 0 0 2 3 】

具体的には、本発明においては、前記ハイブリドーマがE M T 2 - 1 7 H 7 - 2であることが好ましい（請求項6）。

【 0 0 2 4 】

こうしたハイブリドーマによって、エマメクチンおよびその類似化合物に対する高感度かつ選択性が高い抗体を安定的に産出することができることを見出したもので、エマメクチンおよびその類似化合物の免疫学的測定に好適に用いることができる。

【 0 0 2 5 】

本発明は、上記いずれかの抗体またはそのフラグメントを含んでなるエマメクチンおよびその類似化合物の免疫学的測定方法である（請求項7）。

20

【 0 0 2 6 】

本発明のエマメクチンおよびその類似化合物の免疫学的測定方法は、本発明の抗体またはそのフラグメントを用いることにより感度、特異性および操作の簡便性にすぐれた効果を奏する。

【 0 0 2 7 】

また、本発明は、上記いずれかの抗体またはそのフラグメントを含んでなるエマメクチンおよびその類似化合物の測定キットである（請求項8）。

【 0 0 2 8 】

本発明の測定キットは、本発明の抗体またはそのフラグメントおよび測定方法を含むことにより、エマメクチンおよびその類似化合物の免疫学的測定に好適に用いられ、エマメクチンおよびその類似化合物を特異的、高感度および簡便に測定することができる。

30

【発明の効果】

【 0 0 2 9 】

本発明の製造方法は、エマメクチンおよびその類似化合物の抗体製造に好適に用いられるものである。エマメクチンハプテン化合物と高分子化合物との複合体を抗原として用いることにより、動物においてエマメクチンおよびその類似化合物に対する免疫応答を良好に惹起することができ、特異的かつ高感度なエマメクチンおよびその類似化合物に対する抗体を得ることができる。また、前記式（1）で表される化合物において、R₁は - N (C H₃) C O (C H₂)₃ C O O Hの場合、エマメクチンおよびその類似化合物に対する抗体製造のハプテンとして特に優れた効果を奏する。

40

【 0 0 3 0 】

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれの場合も、エマメクチンおよびその類似化合物に対する感性を有し、本発明に係る抗原 - 抗体反応に用いることができる。特に、モノクローナル抗体である場合、エマメクチンおよびその類似化合物に対して高感度であり、しかも他の化合物に対する交差反応性が認められず、エマメクチンおよびその類似化合物を特異的に検出することができる。本発明のハイブリドーマは、前記モノクローナル抗体を安定して産生することができ、例えば、当該ハイブリドーマを培養または由来の動物の腹腔内に投与し腹水を作らせることにより、大量のモノクローナル抗体を製造することができる。また、本発明においては、上記いずれかの抗体またはそのフラグメントを含むことにより、エマメクチンおよびその類似化合物の免疫学的測

50

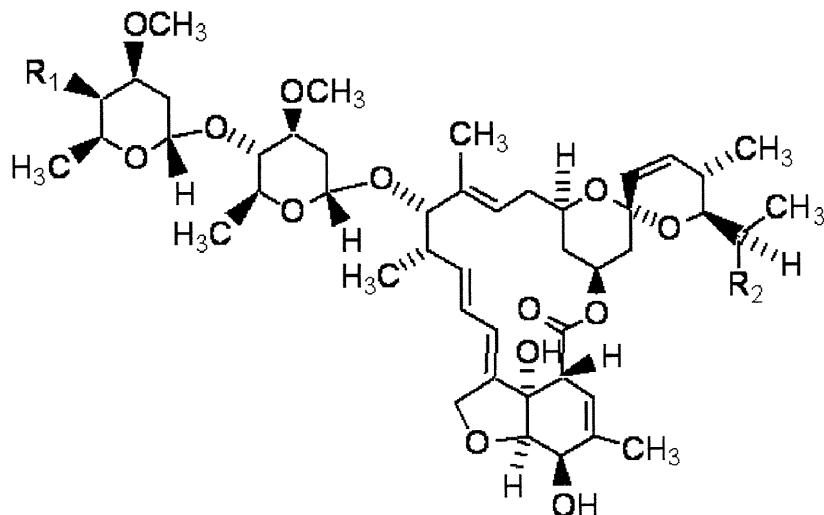
定方法に好適に用いられ、エマメクチンおよびその類似化合物を特異的、高感度および簡便に測定することのできる測定キットを提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0031】

本発明は、下記式(1)：

【化1】



10

20

(式中、R₁はNR₃R₄またはOR₃を、R₂はメチル基およびエチル基を、R₃は水素原子、-CO(CH₂)_nR₅または-(CH₂)_nR₅を、R₄は水素原子または炭素数1から10のアルキル基を、R₅は水素原子、カルボキシル基、アミノ基、アルデヒド基またはヒドロキシル基を、nは0から10の整数を表す。)

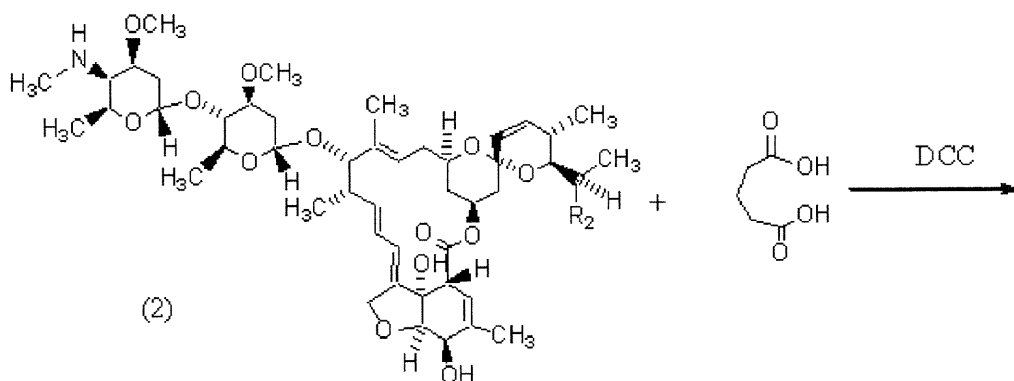
で表わされる構造を有する化合物をハプテンとし、当該ハプテンと高分子化合物との複合体を抗原として用いることによるエマメクチンに対する抗体の製造方法を提供する。該製造方法は、エマメクチンおよびその類似化合物の製造方法として好適に使用される。

【0032】

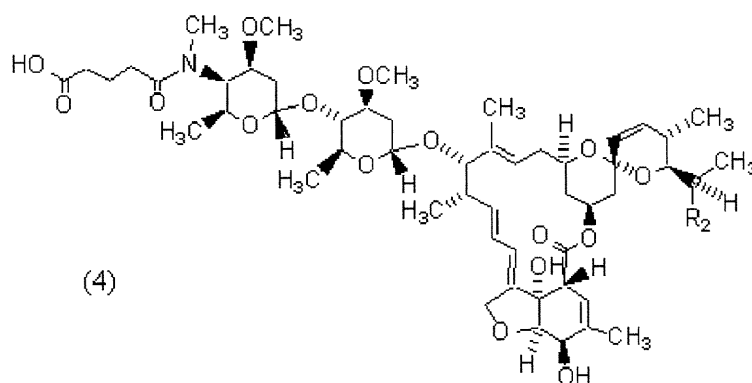
ハプテン化合物として用いる上記化合物(1)の製造は、公知の合成方法により行うことができ、特に限定されるものではないが、例えば化合物(1)のR₁が-N(CH₃)-CO(CH₂)₃-COOHのものは、下記反応式：

30

【化 4】



10



20

(式中 R_2 , n は前述と同じ意味を表す)

で示す方法は、高収率で化合物を得ることから好適に用いられる。

【0033】

具体的には、前記反応式において、出発原料としてのエマメクチン(2)に塩基の存在下 ω - カルボキシアルキルカルボン酸および溶媒の存在下に脱水剤の DCC (ジシクロヘキシルカルボジイミド) を加え反応させてエマメクチンの N - ω - カルボキシアルキルカルボニル誘導体(4)を得る。

30

【0034】

この反応で塩基としては特に限定されないが、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどの水酸化アルカリ金属類、水素化ナトリウム、水素化カリウムなどの水素化アルカリ金属類、ナトリウムメチラート、ナトリウムエチラートなどのアルカリ金属アルコラート類、炭酸カリウム、炭酸ナトリウムなどの炭酸塩類、トリエチルアミン、ピリジン、4 - ジメチルアミノピリジン、DBUなどの有機塩基類などを使用することができる。溶媒としては、例えばメタノール、エタノールなどのアルコール類、塩化メチレン、クロロホルムなどの塩素系溶媒、ベンゼン、トルエンなどの芳香族炭化水素類、ジエチルエーテル、ジブロピルエーテル、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトン、メチルエチルケトンなどのケトン類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミドなどの酸アミド類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、水およびそれらの混合溶媒などを挙げることができる。反応温度は通常室温から溶媒の沸点の温度で、30分から20時間程度行う。詳細な合成方法は、実施例に記載する。

40

【0035】

このようにして得られたエマメクチン誘導体は、牛血清アルブミン(BSA)、ウサギ血清アルブミン(RSA)、オボアルブミン(OVA)、スカシ貝ヘモシアニン(KLH)、チログロブリン(TG)、免疫グロブリン等の高分子化合物(タンパク質)との複合体を形成させた後、抗原として用いる。

50

【 0 0 3 6 】

複合体の形成方法は、公知の方法により行うことができ、特に限定されるものではない。例えば、混合酸無水物法または活性エステル法等によって、エマメクチン誘導体のカルボキシル基と前記高分子化合物の官能基とを反応させて、複合体を形成することができる。

【 0 0 3 7 】

本発明は、上記エマメクチン誘導体と高分子化合物との複合体を抗原として用いることにより得られるエマメクチンおよびその類似化合物に対する抗体を提供する。当該抗体は、エマメクチンおよびその類似化合物に対する特異性を有する抗体である。

【 0 0 3 8 】

抗体には、一般に免疫したウサギやヤギなどから血液を採取後その中に含まれる抗体を分離・精製するいわゆるポリクローナル抗体や、抗体産生能を持つクローン化ハイブリドーマの分泌する抗体を分離・精製するいわゆるモノクローナル抗体がある。本発明においては、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体が包含される。モノクローナル抗体が有する高感度性および高選択性、さらには、複数のモノクローナル抗体の組み合わせによる複数成分との分離可能な反応性など、適用の汎用性の広さから、特にモノクローナル抗体が好ましい。

【 0 0 3 9 】

前記モノクローナル抗体は、エマメクチンおよびその類似化合物に対する特異性と他の物質に対する交差反応性を明確にするため、下記のような IC_{50} 値を有することが好ましい。ここで IC_{50} 値とは、間接競合 ELISA または直接競合 ELISA により標準阻害曲線を求めて、50% 阻害を示す検体の濃度をいう。ここで、ELISA とは、Enzyme-linked Immunosorbent Assay をいう。

【 0 0 4 0 】

すなわち、本抗体は、エマメクチンおよびその類似化合物を測定対象とする場合は、直接競合 ELISA によるエマメクチンおよびその類似化合物に対する IC_{50} が 50 ng/mL 以下であることが好ましく、 10 ng/mL 以下がより好ましい。

【 0 0 4 1 】

前記抗体は、通常の製造方法に従って製造することができる (Current Protocol in Molecular Biology, chapter 11.12 ~ 11.13 (2000))。具体的には、本発明の抗体がポリクローナル抗体の場合には、常法に従ってエマメクチンハプテンと高分子化合物との複合体を形成させた後、当該複合体を家兎等の非ヒト動物に免疫し、該免疫動物の血清から常法に従って得ることが可能である。一方、モノクローナル抗体の場合には、前記複合体を常法に従ってマウス等の非ヒト動物に免疫し、得られた脾臓細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞をスクリーニングし、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを培養することにより得ることができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4 ~ 11.11)。

【 0 0 4 2 】

抗体の調製は、限外ろ過、硫安分画、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過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などの濃縮・精製法を適宜組み合わせで行うことができる。

【 0 0 4 3 】

また、本発明は、前記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供する。以下、マウスでのハイブリドーマの作製方法についてより詳細に説明する。

【 0 0 4 4 】

前記のように、調製した抗原を 2 mg/mL 程度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 マウスの腹腔内に投与する。その後、約 2 週間毎に追加免疫する。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前記マウスの脾臓を摘出し、無血清 DMEM 培地 (ダルベッコ改変イーグル培地) 中で、

10

20

30

40

50

組織片等を取り除いた後に新しい培地中に移し、脾細胞を完全に培地中に浮遊させる。遠心、上清除去を数回繰り返し、細胞を洗った後、マウスのミエローマ細胞（P3X63Ag8.653）と細胞数の比5：1～10：1（脾細胞：ミエローマ）で混合する。細胞を沈殿させ上清を取り除いたあと、攪拌しながら50%ポリエチレングリコール（分子量1500）をゆっくり加え細胞融合を行う。細胞融合後、遠心分離によって集めた細胞に、細胞数が 5×10^5 個/mLになるようにHAT培地を加えて懸濁し、細胞懸濁液を96穴プラスチックプレートに250 μ L/ウェルの量で分注して、37℃、5%炭酸ガス、加湿条件下のインキュベーター中で培養する。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日間培養する。培養液中の抗体の活性をELISA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、限界希釈法によりハイブリドーマのクローニングを行う。クローニングにより、エマメクチンおよびその類似化合物に対する抗体を産生している安定なハイブリドーマ株を得る。

10

【0045】

本発明では、前記方法によりハイブリドーマを作製しEMT2-17H7-2について、2005年9月27日に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に寄託した（受領番号 FERM AP-20667）。

【0046】

本発明のハイブリドーマは、培地（例えば、10%牛胎児血清を含むDMEM）を用いて培養し、その培養液の遠心上清をモノクローナル抗体溶液とすることができる。また、本ハイブリドーマを由来する動物の腹腔に注入することにより、腹水を生成させ、得られた腹水をモノクローナル抗体溶液とすることができる。これらの抗体溶液は、さらに上述のように精製・濃縮することができる。

20

【0047】

また、本発明においては、エマメクチンおよびその類似化合物に特異的に結合する抗体を含むことにより、エマメクチンおよびその類似化合物を簡便に測定することができ、後述するエマメクチンおよびその類似化合物の免疫学的測定方法、および測定手段としての測定キットに好適に使用することができる。

【0048】

さらに、本発明は、前記抗体を用いることを特徴とするエマメクチンおよびその類似化合物の免疫学的測定方法に関する。測定方法としては、通常の抗原-抗体反応を利用する方法であれば特に制限されず、放射性同位元素免疫測定法（RIA）、酵素免疫測定法（EIA）、蛍光もしくは発光測定法、凝集法、イムノプロット法、イムノクロマト法等（Meth. Enzymol., 92, 147-523 (1983), Antibodies Vol.II IRL Press Oxford (1989)）が挙げられるが、感度や簡便性等の点からEIAが好ましく、汎用性の面からELISAがより好ましい。ELISAに用いる酵素としては、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ等が挙げられる。

30

【0049】

ELISAによる測定法は、間接競合ELISAまたは直接競合ELISAなどが挙げられる。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によって行うことができる。

40

【0050】

（1）本発明のモノクローナル抗体を、担体に固相化する。
用いる担体は、96穴、48穴、192穴等のマイクロタイタープレートが好ましい。固相化は、例えば、固相化用抗体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。緩衝液中の抗体の濃度は、通常0.01 μ g/mLから100 μ g/mL程度である。緩衝液としては、検出手段に応じて公知のものを使用することができる。

【0051】

（2）担体の固相表面へのタンパク質の非特異的吸着を防止するため、固相化用抗体が吸着していない固相表面部分を、抗体と無関係なタンパク質等によりブロッキングする。ブロッキング剤としては、BSAもしくはスキムミルク溶液、または市販のブロックエー

50

ス（大日本製薬社製）等を使用することができる。ブロッキングは、前記ブロッキング剤を担体に添加し、例えば、約 4 時間で一晚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、前記（１）と同じ緩衝液を使用することができる。

【 0 0 5 2 】

（３）各種濃度のエマメクチンおよびその類似化合物を含む試料に、エマメクチン誘導体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。

酵素結合ハプテンの調製は、エマメクチン誘導体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。

【 0 0 5 3 】

（４）工程（３）の混合物を工程（２）で得られた抗体固相化担体と反応させる。エマメクチンおよびその類似化合物と酵素結合ハプテンとの競合阻害反応により、これらと固相化担体との複合体が生成する。反応は例えば、約 25 分で約 1 時間行う。反応終了後、緩衝液で担体を洗浄し、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。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、予め作成した検量線から試料中のエマメクチンおよびその類似化合物の量を決定する。

【 0 0 5 4 】

（５）担体に結合した標識酵素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マメクチンおよびその類似化合物の量を算出することができる。

標識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、過酸化水素と、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンまたは o - フェニレンジアミンを含む発色基質溶液を使用することができる。通常、発色基質溶液を加えて室温で約 10 分程度反応させた後、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、450 nm の吸光度を測定する。o - フェニレンジアミンを使用する場合、492 nm の吸光度を測定する。なお、バックグランド値を補正するため、630 nm の吸光度も同時に測定することが望ましい。

標識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、NaOH 溶液を加えて酵素反応を止め、415 nm での吸光度を測定する方法が挙げられる。

エマメクチンおよびその類似化合物を添加しない反応溶液の吸光度に対して、エマメクチンおよびその類似化合物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。既知の濃度のエマメクチンおよびその類似化合物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、試料中のエマメクチンおよびその類似化合物の濃度を算出することができる。

【 0 0 5 5 】

別の態様として、エマメクチンおよびその類似化合物の測定は、以下のような手順により間接競合 E L I S A によって行うことができる。

【 0 0 5 6 】

（１）固相化抗原を担体に固相化する。

用いる担体は、通常の E L I S A に用いる担体であれば特に制限されないが、96 穴等のマイクロタイタープレートが好ましい。固相化は、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。緩衝液中の抗原の濃度は、通常 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度である。緩衝液としては、検出手段に応じて公知のものを使用することができる。

【 0 0 5 7 】

（２）担体の固相表面へのタンパク質の非特異的吸着を防止するため、固相化用抗原が吸着していない固相表面部分を、抗原と無関係なタンパク質等によりブロッキングする。ブロッキング剤としては、BSA もしくはスキムミルク溶液、または市販のブロックエース（大日本製薬社製）等を使用することができる。ブロッキングは、前記ブロッキング剤を担体に添加し、例えば、約 4 時間で一晚インキュベーションした後、洗浄液で洗浄するこ

10

20

30

40

50

とにより行われる。洗浄液としては特に制限はないが、前記(1)と同じ緩衝液を使用することができる。

【0058】

(3)前記(1)および(2)で処理された固相表面に各種濃度のエマメクチンおよびその類似化合物を含む試料および本発明のモノクローナル抗体溶液を加え、該抗体を前記固相化抗原、およびエマメクチンまたはその類似化合物に競合的に反応させて、固相化抗原-抗体複合体および、エマメクチンまたはその類似化合物に対する抗体複合体を生成させる。

反応は、通常室温、1~2時間程度で行うことができる。

エマメクチンおよびその類似化合物は、水に不溶性であるため、反応溶液中には各種有機溶媒を含有することができる。前記有機溶媒としては、エマメクチンおよびその類似化合物を溶解させ、かつ抗原-抗体反応を阻害しない範囲で有機溶媒およびその含有量を選択すればよい。具体的には、メタノール、ジメチルスルホキシド、N,N-ジメチルホルムアミドなどが挙げられ、含有量は5~50重量%程度である。

10

【0059】

(4)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マメクチンおよびその類似化合物の量を決定することができる。

固相化抗原-抗体複合体の量は、酵素標識した二次抗体(マウス抗体を認識する抗体)を添加して測定することができる。例えばエマメクチンおよびその類似化合物に対する抗体としてマウスモノクローナル抗体を用いる場合、酵素標識(例えば、ペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ等)した抗マウス-ヤギ抗体を用いて、担体に結合したエマメクチンおよびその類似化合物に対する抗体と反応させるのが望ましい。反応は、前記(3)と同様の条件下で行えばよい。反応後、緩衝液で洗浄する。

20

【0060】

(5)担体に結合した二次抗体の標識酵素と反応する発色基質溶液を加え、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直接競合阻害ELISA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マメクチンおよびその類似化合物の量を算出することができる。

【0061】

前記本発明の測定方法においては、測定対象物に応じた前処理をして試料とした後、前記直接競合ELISAの工程(3)または間接競合ELISAに供することができる。

30

例えば、測定対象物が土壌または食品の場合、エマメクチンおよびその類似化合物が抽出できる全ての方法を用いることができる。抽出物は、メタノールに転溶させて緩衝液で希釈後、測定試料にする。簡便法として、メタノールで抽出し緩衝液で希釈したものをそのまま試料とすることも可能である。具体的には、例えば試料5gに、メタノール5mLを加えて20分間振とうする。室温で30分間静置した後、抽出物の上層2mLを2500Rpmで10分間遠心分離する。上清を蒸留水で1:4に希釈し、これを前記工程(3)に供する。

また、測定対象物が環境水の場合、抽出工程を必要とせず、直接測定試料とすることが可能である。

40

【0062】

また、本発明は、前記抗体および免疫学的測定方法を用いることを特徴とするエマメクチンおよびその類似化合物の測定キットに関するものである。具体的に本測定キットは、測定法に応じて、酵素標識された二次抗体もしくは酵素標識されたエマメクチン誘導体(抗原)、緩衝液、検出試薬および/またはエマメクチンおよびその類似化合物の標準溶液等から構成される。さらに、好ましくは、本測定キットは、ELISA法に用いられうるものであり、前記直接競合ELISA法に用いる場合、固相化されたエマメクチンおよびその類似化合物に対する抗体、固相化抗体を保持する担体、酵素標識された抗原、標準溶液、検出試薬、反応停止液および洗浄液などを含む。酵素標識された抗原および標準溶液は凍結乾燥されていてもよい。こうした構成からなる測定キットを使用し、前記の直接競

50

合 E L I S A および間接競合 E L I S A による測定方法を用いることによって、エマメクチンおよびその類似化合物を簡便、かつ迅速に測定することができる。

【 0 0 6 3 】

< 実施例 >

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。

【 0 0 6 4 】

〔実施例 1〕 (4 " - e p i - [N - (4 - カルボキシブチリル) - N - メチルアミノ] - 4 " - デオキシアベルメクチン B 1 a / B 1 b (エマメクチンハプテン) の合成 10

2 0 m L のシュレンクチューブにエマメクチン 3 0 m g (0 . 0 3 4 m m o l)、コハク酸 6 . 0 m g (0 . 0 5 1 m m o l) および 4 - ジメチルアミノピリジン 4 . 0 m g (0 . 0 3 4 m m o l) を入れ、アルゴン置換した。さらに窒素気流下にて塩化メチレンを 2 m L 加え、アイスバスにて 0 に冷却した。次にジシクロヘキシルカルボジイミド 1 4 . 0 m g (0 . 0 6 8 m m o l) を加えて室温にて 1 2 時間攪拌した。得られた反応混合物をシリカゲルクロマトグラフィー (塩化メチレン / メタノール = 1 0 / 1) で単離精製し、 8 . 0 m g の無色透明粘稠液体の生成物を得た。

【 0 0 6 5 】

〔実施例 2〕 (免疫原の調製)

免疫原として、スカシ貝ヘモシアニン (K L H) と本発明エマメクチンハプテンとの結合体を、活性エステル法を用いて作製した。

実施例 1 で製造した 4 " - e p i - [N - (4 - カルボキシブチリル) - N - メチルアミノ] - 4 " - デオキシアベルメクチン B 1 a / B 1 b (エマメクチンハプテン) 1 . 5 m g、N - ヒドロキシスクシンイミド 1 . 2 m g および 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミド塩酸塩 1 . 9 m g を、N , N - ジメチルホルムアミド 2 0 0 μ L に溶解し、この溶液を 2 5 の暗所に 1 . 5 時間放置しエマメクチンハプテン溶液とした。

別途、0 . 1 M ホウ酸緩衝液 (p H 8 . 0) 1 m L に K L H を 1 0 m g 加え、一晚攪拌することにより、K L H 溶液を得た。

この K L H 溶液に、先に調製したエマメクチンハプテン溶液を徐々に滴下し、暗所にて室温で 1 . 5 時間攪拌した。反応終了後、4 で 2 日間生理的リン酸緩衝液 (P B S、1 0 m M リン酸緩衝液、1 5 0 m M N a C l、p H 7 . 0) に対して透析した後、- 4 0 で貯蔵した。このようにして得られたエマメクチンハプテンと K L H との結合体を免疫原として使用した。

【 0 0 6 6 】

〔実施例 3〕 (固相化抗原の調製)

固相化抗原としてウシ血清アルブミン (B S A) とエマメクチンハプテンとの結合体を、活性エステル法を用いて作製した。

エマメクチンハプテン 1 . 5 m g、N - ヒドロキシスクシンイミド 1 . 2 m g および 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミド塩酸塩 1 . 9 m g を、N , N - ジメチルホルムアミド 2 0 0 μ L に溶解し、この溶液を 2 5 の暗所に 1 . 5 時間放置しエマメクチンハプテン溶液とした。

別途、0 . 1 M ホウ酸緩衝液 (p H 8 . 0) 1 m L に B S A を 1 0 m g 加え、一晚攪拌することにより、B S A 溶液を得た。

この B S A 溶液に、先に調製したエマメクチンハプテン溶液を徐々に滴下し、暗所にて室温で 1 . 5 時間攪拌した。反応終了後、4 で一晚 P B S 緩衝液 (P B S、1 0 m M リン酸緩衝液、1 5 0 m M N a C l、p H 7 . 0) に対して透析した後、3 0 で貯蔵した。このようにして得られたエマメクチンハプテンと B S A との結合体を固相化抗原として使用した。

10

20

30

40

50

【0067】

〔実施例4〕（マウスへの免疫）

実施例2で調製した免疫原を2mg/mLとなるようにPBS緩衝液（0.4%BSA、10mMリン酸ナトリウム緩衝液（以下「NaPB」という）、150mM NaCl、pH7.0）に溶解し、これに等量の完全アジュバント（商品名：フロイント完全アジュバント；FCA）を等量混合しエマルジョン化し、その100μLを7週齢のメスのBALB/cマウスに腹腔投与した。これと同様の手順で、不完全アジュバント（商品名：フロイント不完全アジュバント；FICA）を等量混合し、2週間後に追加免疫した。更に0.25mg/mLの免疫原を不完全アジュバントと等量混合し、その100μLを2週間毎に追加免疫した。4回の免疫後、眼底から採血し、血清中の抗体力価とエマメクチンに対する阻害を間接競合法で確認した。 10

【0068】

〔実施例5〕（抗血清の間接競合試験）

（1）4回の免疫から1週間後に、マウスの眼底から採血し、血清部分を10%ブロックエース-PBS緩衝液で100倍希釈し抗血清希釈液とした。

（2）実施例3で調製した固相化抗原をPBS緩衝液で5.0μg/mLに調製し、96穴マイクロプレートに100μL/ウェルずつ分注、4で一晩静置することにより固相化した。次に液を吸引除去後、25%ブロックエース-PBS緩衝液を300μg/ウェル分注、4で一晩静置することによりブロッキングを行い固相化プレートとした。

（3）抗血清希釈液を10%ブロックエース-PBS緩衝液で順次希釈し、固相化プレートに100μL/ウェルずつ分注、20で一時間静置反応させた後、プレートを洗浄した。 20

（4）ブロックエースで4000倍に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）結合抗マウスIgGヤギ抗体（第2抗体）の10%PBS溶液を100μL/ウェル加え、室温で一時間静置した後、プレートを洗浄した。

（5）HRP基質溶液（100μg/mLの3,3',5,5'-テトラメチルベンチジンおよび0.006%過酸化水素を添加した0.1M酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.5））を100μL/ウェル加え、25で一時間反応、発色させた。1N硫酸を100μL/ウェル加えて酵素反応を止め、450nmの吸光度を測定した。最終希釈倍数が800倍で約1.0の吸光度を示す2匹のマウス（No1、No2）の抗血清について、以下のようにしてエマメクチンに対する阻害試験を行った。 30

（6）0.2%BSA-PBS緩衝液で400倍に希釈した抗血清溶液と10%ブロックエースBSA-PBS緩衝液で希釈した各種濃度のエマメクチン標準液を等量混合し、固相化プレートに100μL/ウェルずつ分注して、25に一時間静置反応させた。

（7）以後の操作は（4）、（5）と同様に行った。抗血清の間接阻害試験結果を図1に示す。

【0069】

〔実施例6〕（モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製）

十分に力価が高くなったことを確認し、1週間後に最終免疫として免疫原10μg/100μL・PBSを尾静脈から投与した。その3日後に当該マウスから脾臓を摘出し細胞融合に供した。 40

摘出した脾臓を無血清DMEM培地（ダルベッコ改変イーグル培地）中で余分な組織片を切除したあと、脾臓から完全に細胞を取り出し、培地中に浮遊させた。浮遊している大きな組織片を沈降させるために5分間静置、細胞浮遊液を遠沈管に集め、1500rpmで遠心し、上清を吸引除去して、新しい無血清DMEMを添加して細胞を浮遊させた。この操作を2回繰り返した。

あらかじめ培養してあったミエローマ細胞（P3X63Ag8.653）を回収し、遠沈、上清除去、無血清DMEM培地で再浮遊を2回繰り返した。

それぞれの細胞数を計数して脾細胞とミエローマ細胞との比率が10:1~7.5:1になるように混合し、1500rpmで5分間遠心して、上清を吸引除去した。 50

遠沈管を激しく攪拌しながら50%ポリエチレングリコール(分子量1500)溶液2mLを約60秒かけて添加した。次いで約10mLの無血清DMEMを攪拌しながら3~4分かけて添加した。

遠沈管を1000rpm, 5分で遠心して上清を完全に吸引除去し、脾細胞が 2.5×10^6 個/mLになるようにHT培地(ヒポキサンチン、チミジン、10%牛胎児血清入りDMEM培地)に浮遊させ、96穴培養プレートに100 μ L/ウェル分注し、37、8%炭酸ガス、加湿条件下で培養を開始した。

翌日に約40 μ L/ウェルのHAT培地(ヒポキサンチン、チミジン、アミノプテリン、10%牛胎児血清入りDMEM培地)を添加し、ミエローマ細胞が死滅し、ハイブリドーマ細胞のコロニーが形成されるまで観察を続け、以後は細胞の状態を見ながらHT培地を添加した。

培養開始から10日後に培養液を採取し、間接競合阻害法でエマメクチンに対する抗体を産生しているウェルを選別し、96ウェル、48ウェル、24ウェルと順次培養スケールを上げた。

24ウェルの段階で限界希釈法によるクローニングを行い、エマメクチンに対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株 [EMT2-17H7-2]を得た。

【0070】

〔実施例7〕 (モノクローナル抗体の作製)

実施例6で得られたハイブリドーマ株を10%牛胎児血清入りDMEMで培養し、約 2×10^7 個の細胞をBALB/cメスマウスの腹腔内に注射し、腹水液を採取した。

得られた腹水はプロテインGカラムによりIgG精製を行い、抗エマメクチン抗体EMT2-17H7-2を得た。

【0071】

〔実施例8〕 (エマメクチンハプテンとHRPとの結合体の調製)

直接競合ELISAにおいてトレーサーとして用いるため、活性エステル法によりエマメクチンハプテンとHRPとの結合体を調製した。エマメクチンハプテン1.5mg、N-ヒドロキシスクシンイミド1.2mgおよび1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩1.9mgを、N,N-ジメチルホルムアミド200 μ Lに溶解し、この溶液を25の暗所に1.5時間放置しエマメクチンハプテン溶液とした。

別途、0.1Mホウ酸緩衝液(pH8.0)1mLにHRPを10mg加え、一晚攪拌することにより、HRP溶液を得た。

このHRP溶液に、先に調製したエマメクチンハプテン溶液を徐々に滴下し、暗所にて室温で1.5時間攪拌した。反応終了後、4で一晩生理的リン酸緩衝液(PBS、10mMリン酸緩衝液、150mM NaCl、pH7.0)に対して透析した後、30で貯蔵した。ゲル濾過で精製を行い、濃度の測定はDCプロテインアッセイで行った。

【0072】

〔実施例9〕 (直接競合ELISA法によるエマメクチンの測定)

(1) 抗マウスIgGヤギ抗体をPBS緩衝液(10mM NaPB, 150mM NaCl)で10 μ g/mLに希釈し、96穴マイクロプレートに100 μ g/ウェルずつ分注し、4で一晩放置することにより固相化した。次に液を吸引除去後、PBS緩衝液(0.4%BSA、10mM NaPB、150mM NaCl、pH7.0)を300 μ g/ウェル分注し、4で一晩静置することによりブロッキングを行った後、ブロッキング液を吸引除去した。

(2) 実施例7で得られたモノクローナル抗体EMT2-17H7-2をPBS緩衝液(0.2%BSA、10mMリン酸緩衝液、150mM NaCl、pH7.0)で0.05 μ g/mLに希釈し、(1)で作製した抗マウスIgGヤギ抗体固相化プレートに100 μ g/ウェルずつ分注し、20で1時間静置した後、PBSで洗浄し抗体固相化プレートとした。

(3) HRPとエマメクチンハプテンの結合体をPBS緩衝液(0.4%BSA、10m

10

20

30

40

50

Mリン酸緩衝液、150 mM NaCl、pH 7.0)で0.12 µg/mLに希釈しHRP希釈液とした。

(4) 上記HRP希釈液と10%メタノール溶液に溶解したエマメクチンの標準溶液(0.125、0.25、0.5、1.0、2.5、5および10 µg/mL)を等量混合し、その混合液の100 µg/ウェルを(2)で得られた抗体固相化プレートに加え、20で1時間静置した後、PBSで洗浄した。

(5) HRP基質溶液(100 µg/mLの3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジンおよび0.006%過酸化水素を添加した0.1 M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.5))100 µLをウェルに加え、25で10分間インキュベーションした後、1 N硫酸100 µLをウェルに加えて酵素反応を止め、450 nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

10

モノクローナル抗体EMT2-17H7-2溶液についての直接競合阻害法によるエマメクチンの標準阻害曲線を図2に示す。モノクローナル抗体EMT2-17H7-2溶液を用いた直接競合ELISA法によるエマメクチンの測定可能な範囲は0.25 ng/mL ~ 3 ng/mLであり、50%阻害を示す値(IC₅₀値)は0.7 ng/mLであった。

【0073】

以上の結果から、本発明のエマメクチン誘導体を用いて得られるモノクローナル抗体を使用する直接競合ELISA法により、エマメクチン分析の大幅な簡略化および測定時間の短縮が可能となり、多数の検体を迅速、簡便かつ低コストで測定できることがわかる。

20

【0074】

〔実施例10〕 (抗体のエマメクチン構造類似化合物に対する交差反応性)

エマメクチンと化学構造が類似している農薬および代謝物、および抗生物質農薬について抗体EMT2-17H7-2の交差反応性を調べた。交差反応性は、実施例9に記載の方法と同様にして試験化合物のIC₅₀値を求め、次式により計算し交差反応率を算出した。

交差反応率(%) = (エマメクチンのIC₅₀値 / 試験化合物のIC₅₀値) × 100
その結果、殺ダニ剤アバメクチン〔化5〕(日本未登録)、エマメクチン代謝物のアミノ体、ホルミルアミノ体、N-メチルホルミルアミノ体に対しては高い交差反応性を示したのに対し、ミルベメクチン〔化6〕、スピノサド、ストレプトマイシンに対しいずれも交

30

差反応性は0.1%以下であり、抗体EMT2-17H7-2はエマメクチン、その類縁体のアバメクチンおよび代謝生成物のアミノ体、ホルミルアミノ体、N-メチルホルミルアミノ体に特異的な抗体と云える。
抗体EMT2-17H7-2を用いた直接競合ELISA法におけるエマメクチン代謝生成物(アミノ体、ホルミルアミノ体、N-メチルホルミルアミノ体)、アバメクチンに対する交差反応性を、表1に示す。

【0075】

【表 1】

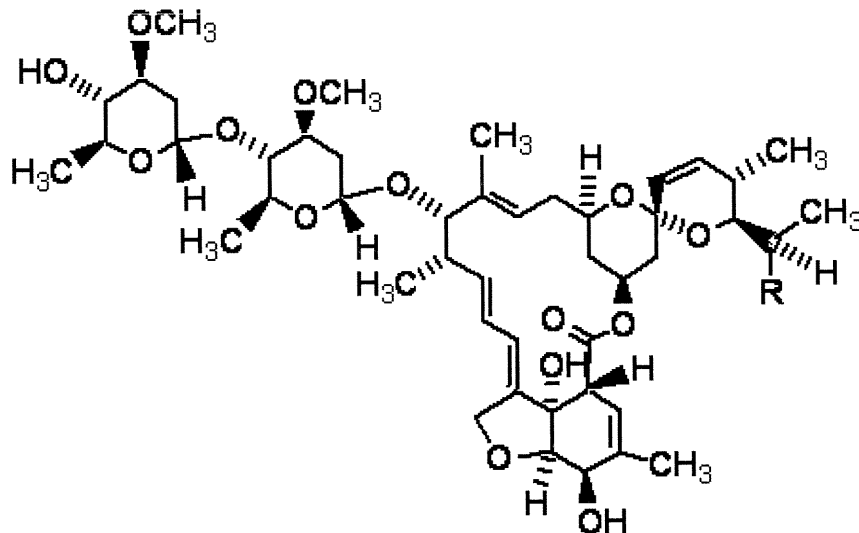
化合物名	交差反応率 (%)
エマメクチン	1 0 0
エマメクチン代謝物 (アミノ体)	1 3 8
エマメクチン代謝物 (ホルミルアミノ体)	5 8
エマメクチン代謝物 (N-メチルホルミルアミノ体)	3 3
アバメクチン	5 5

10

【0076】

ここで、アバメクチンとは、アバメクチン B 1 a と B 1 b の 4 : 1 の混合物であって、下式 (5) に示す化合物を表す。

【化 5】



20

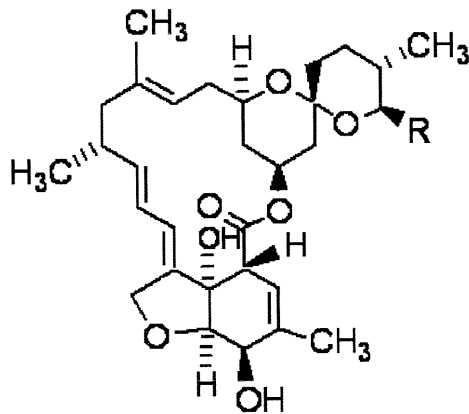
30

(式中 R は、 C_2H_5 (アバメクチン B 1 a) と CH_3 (アバメクチン B 1 b) を表す)

【0077】

ここで、ミルベメクチンとは、ミルベメクチン A 3 と A 4 の 3 : 7 の混合物であって、下式 (6) に示す化合物を表す。

【化 6】



10

(式中Rは、 C_2H_5 (ミルベメクチンA4)と CH_3 (ミルベメクチンA3)を表す)

【図面の簡単な説明】

【0078】

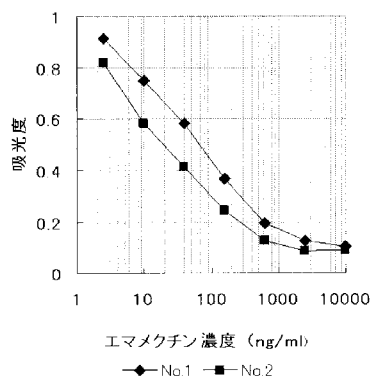
【図1】抗血清を用いた間接競合ELISA法におけるエマメクチンに対する阻害曲線 (マウスNo1, No2)を示す。

【0079】

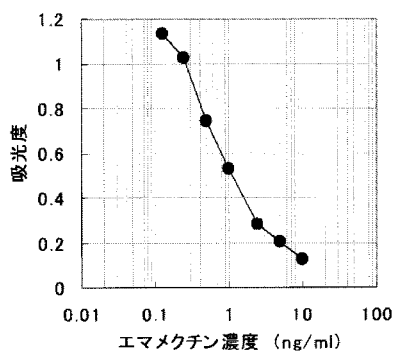
【図2】抗体EMT2-17H7-2を用いた直接競合ELISA法におけるエマメクチンに対する阻害曲線を示す。

20

【図 1】



【図 2】



 フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 C 0 7 D 493/22 (2006.01) C 0 7 D 493/22

(72)発明者 山下 弘
 京都府京都市南区吉祥院宮の東町 2 番地 株式会社ホリバ・バイオテクノロジー内

(72)発明者 内ヶ島 美枝子
 京都府京都市南区吉祥院宮の東町 2 番地 株式会社ホリバ・バイオテクノロジー内

(72)発明者 伊東 茂壽
 京都府京都市南区吉祥院宮の東町 2 番地 株式会社ホリバ・バイオテクノロジー内

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA53 GA03 GA08 GA09 GA27 HA03 HA15
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24 CD30 CE12 DA13
 4B065 AA91X AB05 AC14 BA08 BB40 CA25 CA46
 4C071 AA04 AA07 BB03 BB05 CC14 EE05 FF17 GG01 HH05 HH09
 JJ06 KK17 LL02 LL10
 4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA75 DA76 EA50 FA71 FA72 GA26

专利名称(译)	产生针对emamectin及其类似物的抗体的方法，抗体，杂交瘤，免疫测定方法和用于其的测定试剂盒		
公开(公告)号	JP2007131544A	公开(公告)日	2007-05-31
申请号	JP2005323537	申请日	2005-11-08
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社堀场制作所		
申请(专利权)人(译)	株式会社堀场制作所		
[标]发明人	山下弘 内ヶ島美枝子 伊東茂壽		
发明人	山下 弘 内ヶ島 美枝子 伊東 茂壽		
IPC分类号	C07K16/44 C12N15/02 C12N5/10 G01N33/53 C12P21/08 C07D493/22		
FI分类号	C07K16/44 C12N15/00.C C12N5/00.B G01N33/53.S C12P21/08 C07D493/22 C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/GA03 4B024/GA08 4B024/GA09 4B024/GA27 4B024/HA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/CD30 4B064/CE12 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/BB40 4B065/CA25 4B065/CA46 4C071/AA04 4C071/AA07 4C071/BB03 4C071/BB05 4C071/CC14 4C071/EE05 4C071/FF17 4C071/GG01 4C071/HH05 4C071/HH09 4C071/JJ06 4C071/KK17 4C071/LL02 4C071/LL10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/GA26		
代理人(译)	Kajisaki浩一 尾崎雄三 谷口俊彦 现在树高尾		
其他公开文献	JP4509007B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：产生对emamectin及其类似物（主要是emamectin的代谢产物）高度敏感和高度选择性的抗体，针对emamectin及其类似物的抗体以及该抗体为灵芝菌素及其类似化合物提供高度灵敏且定量效果优异的免疫学测定方法和测定试剂盒。本发明的特征在于使用与上述Emamectin（16元环大环内酯杀虫剂）相似的化合物作为半抗原，并使用半抗原和高分子化合物的复合物作为抗原。[选择图]无

