

(19)日本国特許庁 ( J P )

# (12) 公開特許公報 ( A )

(11)特許出願公開番号

## 特開2001 - 278844

(P2001 - 278844A)

(43)公開日 平成13年10月10日(2001.10.10)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ト <sup>*</sup> ( 参考 )
C 0 7 C 69/747		C 0 7 C 69/747	T 4 B 0 2 4
233/25		233/25	4 B 0 6 4
233/63		233/63	4 B 0 6 5
C 0 7 K 16/44		C 0 7 K 16/44	4 H 0 0 6
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 15 O L ( 全 24数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 91132(P2000 - 91132)

(22)出願日 平成12年3月29日(2000.3.29)

(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

(72)発明者 伊東 茂壽

東京都港区芝浦4丁目9番25号 株式会社環境免疫技術研究所内

(72)発明者 三宅 司郎

東京都港区芝浦4丁目9番25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

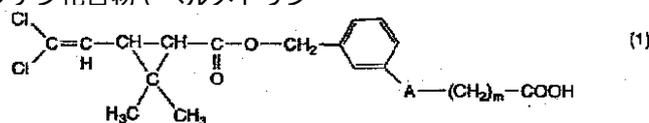
(54)【発明の名称】 ペルメトリンのハプテン化合物、抗体及び測定方法

(57)【要約】 ( 修正有 )

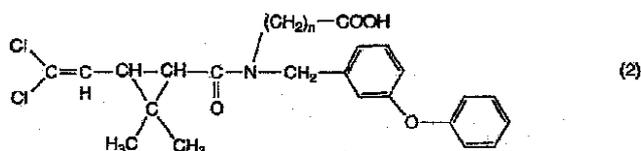
【課題】 ペルメトリンに反応する新規な抗体若しくはそのフラグメント及びその製造方法、ペルメトリンに反応性を有するモノクローナル抗体、新規な抗体を作製するための抗原を構成するハプテン化合物 ( ペルメトリン

ハプテン)、それと高分子化合物との結合体、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。

【解決手段】 一般式 1 又は 2 の化合物



[ A は O 又は NHCO, m は 1 - 10 の整数である。 ]



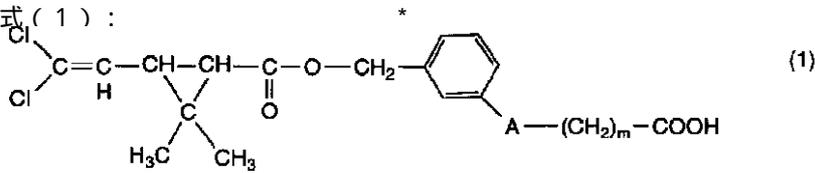
[ n は 1 - 10 の整数である。 ]

1

2

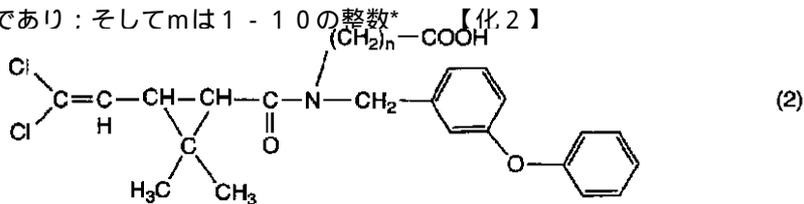
【特許請求の範囲】

【請求項1】以下の式(1)：



[式(1)中、

AはO又はNHCOであり：そしてmは1 - 10の整数\*である。]又は以下の式(2)：

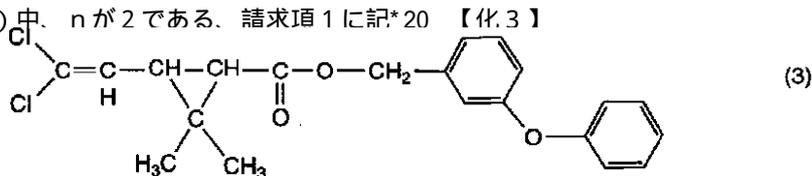


[式(2)中、nは1 - 10の整数である。]で表される構造を有する化合物。

【請求項2】式(1)中、AがOである、請求項1に記載の化合物。

【請求項3】式(1)中、mが1である、請求項2に記載の化合物。

【請求項4】式(2)中、nが2である、請求項1に記\*20



で表され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7】請求項5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)の化合物と反応性を示す抗体又はそのフラグメント。

【請求項8】式(3)の化合物に加えて、アレスレン、ピレトリンとも反応性を示す、請求項7に記載の抗体又はフラグメント。

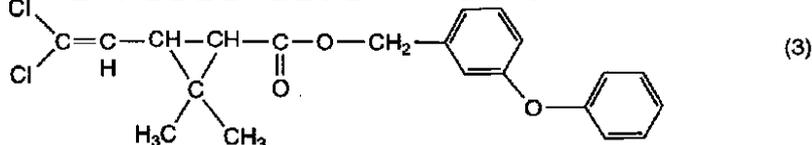
【請求項9】モノクローナル抗体である、請求項7若しくは8に記載の抗体又はフラグメント。

【請求項10】寄託番号FERM P - 17773で寄託されているハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体PMT204である、請求項7ないし9のいずれか1項に記載の抗体又はフラグメント。

【請求項11】請求項7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 - 17773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7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、\*



【0005】で表される構造を有する、合成ピレスロイド系殺虫剤である。ピレスロイドは、シロバナムシヨケ

\*載の化合物。

【請求項5】請求項1ないし4に記載された化合物と高分子化合物又は標識物質との結合体。

【請求項6】請求項1ないし4に記載の化合物と高分子化合物を結合させることにより抗原を作製し、当該抗原を用いることにより、以下の式(3)：

\*式(3)で表される化合物の免疫化学的測定方法。

【請求項14】式(3)の化合物に加えて、アレスレン、ピレトリンも測定する、請求項13に記載の免疫化学的測定方法。

【請求項15】さらに請求項1ないし4に記載の化合物又は請求項5に記載の結合体を用いることを含む、請求項13若しくは14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、3 - フェノキシベンジル = (1RS, 3RS) - (1RS, 3RS) - 3 - (2, 2 - ジクロロビニル) - 2, 2 - ジメチルシクロプロパンカルボキシレート (以下、本明細書中「ペルメトリン」と言う) 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】ペルメトリンは、以下の式(3)：

【0004】

【化4】

ギクの花に含まれる主殺虫成分がピレトリンとその類縁化合物の総称であり、従来から蚊取り線香やエアゾールなどの家庭用殺虫剤として使用されてきた。この天然ピレスロイドの構造が改変された結果、殺虫スペクトルの広い農業用殺虫剤として実用化されるようになった。ピレスロイドの構造は、分子がエステル結合によってシクロプロパン環を含む酸部分と、五員環不飽和ケトンを含むアルコール部分からなることを基本としている。しかしながら最近登録された合成ピレスロイドは必ずしもこの基本構造を持たず、作用機構がピレスロイドに類似していることによって、合成ピレスロイドとして分類されており、シクロプロパン環を持たない化合物や、エステル結合ではなくエーテル結合を持つ化合物が登録された。さらに、分子内に不斉炭素を有することから、殺虫効力の強い一方の光学異性体のみを利用する光学活性合成ピレスロイド剤が開発された。

【0006】ピレスロイドの作用点は神経系にある。昆虫の中枢及び末梢（シナプスを含む）神経膜のナトリウムイオンチャンネルに作用してそのイオンチャンネルの閉鎖を遅らせて正常な刺激伝達を阻害すると考えられている。ピレスロイドが神経系に作用すると反復興奮による異常興奮及び興奮伝導の抑制が起こり、昆虫は痙攣、ノックダウンに続いて麻痺に陥り遂には死に至る。このように有機リン剤やカーバメート剤とは異なる殺虫機構を有することにより、既存の殺虫剤に抵抗性を持つ害虫に対しても高い殺虫効果を示す。合成ピレスロイドは、家庭園芸、果樹、野菜に加えて水稻の鱗翅目、半翅目、昆虫目、アザミウマなどの広範な害虫に対して、接触毒あるいは食毒を有し、速効的に害虫に作用する。また、安定性、耐雨性に富み、天然ピレスロイドの欠点であった残効性が高められている。しかし、一方では、ピレスロイド剤に対する薬剤抵抗性の発達や、一部の薬剤でハダニのリサージェンス問題も指摘されており、使用に当たっては十分な注意が必要である。

【0007】魚毒性は一般に強く、そのような薬剤の使用においては散布された薬剤の水域への飛散又は流入を防ぎ、一時に広範囲での使用は避けるなど十分な注意を要する。また、カイコに対しては長期間毒性がある。合成ピレスロイド剤の薬害としては、エアゾール剤の新芽、花卉への散布により冷害のおそれがある。また、アブラナ科や品種によっては黄化などの現象があるので、使用に際しては十分な注意が望まれる。

【0008】ペルメトリンは、1985年に登録された合成ピレスロイド系殺虫剤で、茶、果樹、野菜などの主要害虫の防除に使用される。神経膜のNaイオン透過性を変化させ神経伝導異常を引き起こす神経系への作用が、殺虫機構であると考えられている。接触毒及び経口毒作用により強い殺虫力を示しノックダウン効果が見られる。耐雨・耐光性があり残効性を示す。作物に対して薬害がほとんどなく、果樹の春季防除や野菜の幼苗期に

使用できる（農薬ハンドブック 第89頁 - 第94頁及び第617頁、1998年版（社）日本植物防疫協会）。

【0009】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。ペルメトリンについては、食品規格残留農薬基準が、大豆、ばれいしょ、なたね、コーヒー豆等で0.05ppm、小豆類、らっかせい、さとうきび、だいこん類、にんじん、メロン類、マッシュルーム、アーモンド等で0.1ppm、えんどう、そら豆、その他の豆類、さといも類、かんしょ、こんにゃく等のいも類等で0.2ppm、西洋わさび、カリフラワー、きゅうり、かぼちゃ、みかん、綿実等で0.5ppm、トマト、なず、いちご、ラズベリー、ブラックベリー等で1.0ppm、米、小麦、とうもろこし等の穀類、セロリ、ほうれんそう、りんご、日本なし、西洋なし、ももあんず、キウイ等で2.0ppm、ごぼう、たまねぎ、ねぎ、パセリ、ピーマン、しいたけ等の野菜類、きのこ類等で3.0ppm、レモン、オレンジ等の果実類で5.0ppm等と定められている。また、水質について水質汚濁に係る登録保留基準が1mg/lと規定されている（「改訂3版 農薬登録保留基準ハンドブック」第811頁 - 第813頁、1998.9.25 化学工業日報社 発行）。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、ペルメトリンの量を迅速かつ正確に測定することが必要である。

【0010】従来ペルメトリンは、例えば穀類、豆類、果実類、野菜等から抽出し、精製した後、ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)又はガスクロマトグラフ/電子捕獲検出器(GC/EC)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、ヘキサンに転溶し、ヘキサン-アセトニトリル分配した後、n-ヘキサンとエーテルを溶媒としたケイ酸マグネシウムカラムクロマトグラフィーで精製後、GC/MS又はGC/ECで測定する方法等が採用されている（「改訂3版 農薬登録保留基準ハンドブック」上記、第16頁 - 第19頁）。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。ペルメトリ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。

【0011】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

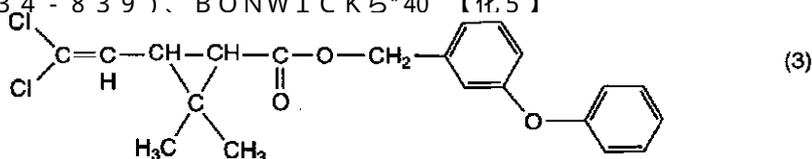
質、金属原子、ゾル、ラテックス及びバクテリオファージが適用されてきた。

【0012】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。

【0013】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、ペルメトリ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こし、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。

【0014】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 Spacer-arm (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。

【0015】ペルメトリンについては、Stankerら(J. Agric. Food Chem. 1989, 37(3) p. 834-839)、BONWICKら\*40



【0025】で表される構造を有する化合物である。本発明の抗体は、例えば、ペルメトリンの一部分にSpacer-arm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

\* (Food & Agricultural Immunology (1994) 6(4), p. 341-356)、並びに特公平7-64880が抗体及び抗体を用いた免疫学的測定法について記載している。しかしながら、適切な抗体及び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。

【0016】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ペルメトリン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<sub>a</sub>断片等を意味する。

【0017】本発明はその一態様において、ペルメトリンに反応性を有するモノクローナル抗体を提供する。

【0018】本発明は、また、ペルメトリ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(ペルメトリンハプテン)を提供することを目的とする。

【0019】本発明は、さらに、ペルメトリ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。

【0020】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。

【0021】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/又は前記ペルメトリ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目的とする。

【0022】

【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、ペルメトリン又はその部分にSpacer-arm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、ペルメトリ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。

【0023】本発明の対象となるペルメトリンは、以下の式(3)：

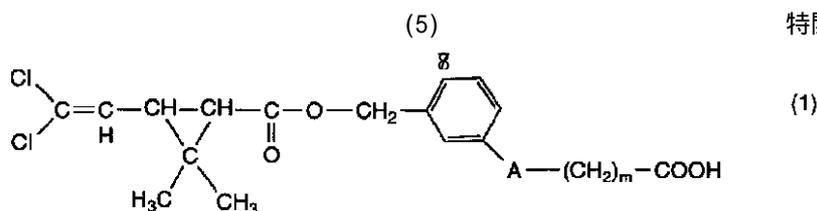
【0024】

【化5】

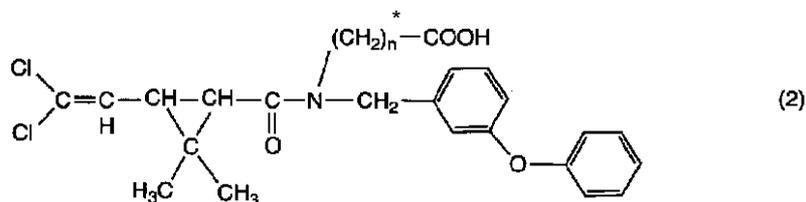
のを抗原として用いることによって得ることができる。例えば、以下の式(1)：

【0026】

【化6】



【0027】[式(1)中、AはO又はNHCOであり；そしてmは1-10の整数である。]又は以下の式(2)：



【0029】[式(2)中、nは1-10の整数である。]で表される構造を有する化合物を、抗体作製のためのハプテンとして使用する。

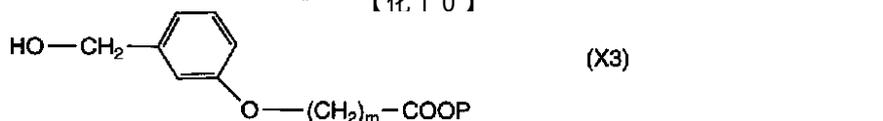
【0030】式(1)中、Aは好ましくはOである。また、mは好ましくは1である。式(2)中、nは好ましくは2である。

【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、ペルメトリ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ペルメトリンの免疫化学的測定方法に関する。

#### 【0032】ペルメトリンハプテンの作製 I. 式(1)の化合物の一般的製造方法

式(1)で表されるペルメトリンハプテンは、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) A=Oの場合  
先ず、以下の式(X1)：



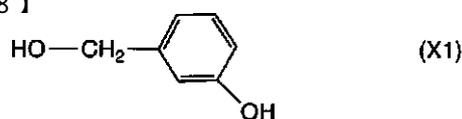
【0039】[式(X3)中、Pおよびmは先に定義した通りである]で表される構造を有する化合物を得る。

【0040】有機溶媒としては、例えば、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、メタノール、エタノール、ベンゼン、トルエン、キシレン、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、アセトン、メチルエチルケトン、アセトニトリル、酢酸エチル、ジメチルスルホキシド等を用いることができる。塩基としては、例えば、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、ナトリウムメチラート、ナトリウムエチラート等が挙げられる。

【0041】Pで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

\*【0028】  
【化7】

\*【0034】  
【化8】



【0035】で表される構造を有する3-ヒドロキシベンジルアルコールに、有機溶媒中、塩基の存在下で、以下の式(X2)：

【0036】  
【化9】



20 【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又はIから選択されるハロゲン原子であり；そして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(X3)：

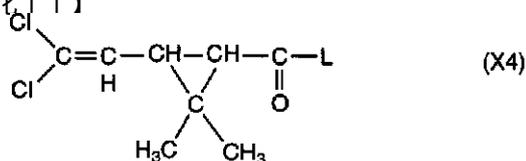
【0038】  
【化10】

30 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チル基等を挙げることができる。

【0042】反応は、0 から溶媒の沸点の温度、好ましくは50 から120 で、5分から10時間、好ましくは30分から3時間行う。

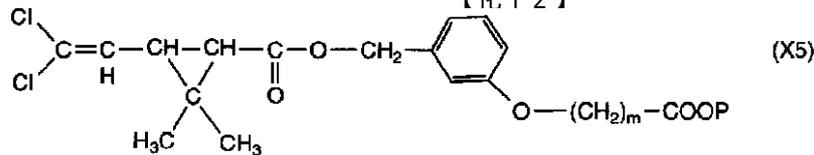
【0043】次いで、式(X3)の化合物に、有機溶媒中、トリエチルアミン、ピリジン、炭酸水素ナトリウム等の塩基の存在下、以下の式(X4)：

【0044】  
【化11】



【0045】[式(X4)中、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、反応させて、以下の式(X5) :



【0047】[式(X5)中、Pおよび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。

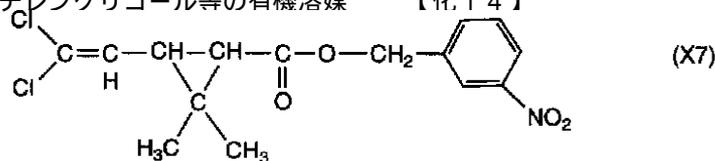
【0048】式(X5)の化合物の合成のための有機溶媒としては、例えば、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、ベンゼン、トルエン、ジエチルエーテル、アセトニトリル、酢酸エチル等を挙げることができる。

【0049】反応は、0 から溶媒の沸点の温度、好ましくは20 から80 で、5分から10時間、好ましくは30分から3時間行う。

【0050】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、アルカリ加水分解、酸加水分解等の公知の方法で行うことができる。

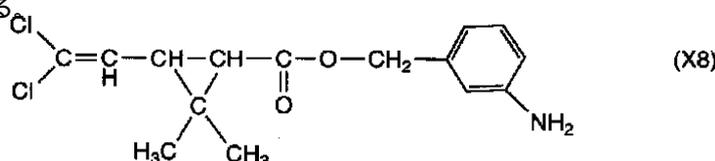
【0051】すなわち、酸加水分解の場合は、式(X5)の化合物を、好ましくは酢酸、蟻酸、ベンゼン、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン等の有機溶媒に溶解し、次いで塩酸、硫酸、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体、トリフルオロ酢酸、トリフルオロメタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等を加えて、0 から溶媒の沸点の温度、好ましくは0 から50 で、5分から10時間、好ましくは1時間から5時間攪拌反応させることにより式(1)の化合物を得ることができる。

【0052】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\*



【0060】で表される構造を有する2-(2,2-ジクロロビニル)-3,3-ジメチルシクロプロパンカルボン酸 3-ニトロベンジルを合成する。

【0061】反応は、0 から溶媒の沸点の温度、好ましくは20 から80 で、5分から10時間、好ましくは30分から5時間行う。有機溶媒および塩基は、式(X5)の化合物の合成について上述したのと同様のものを使用することができる。



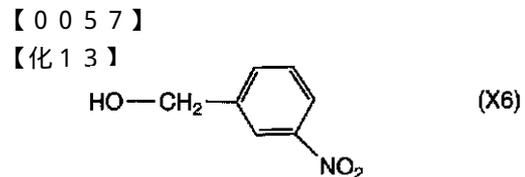
\*に溶解し、次いで炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、水酸化リチウム、水酸化ナトリウム又は水酸化カリウム水溶液等を加えて、0 から溶媒の沸点の温度、好ましくは0 から室温で、5分から10時間、好ましくは1時間から2時間攪拌反応させることにより式(1)の化合物を得ることができる。

【0053】更に、Pがベンジル基の場合、除去は水素による加水素分解によっても行うことができる。

【0054】更にまた、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。

【0055】なお、式(X4)の化合物は、ペルメトリンを加水分解し、得られたカルボン酸を塩化チオニル等でハロゲン化することにより得ることができる。

【0056】i i) A = NHCOの場合  
先ず、上記式(X4)の化合物に、有機溶媒中、塩基の存在下、以下の式(X6) :



【0058】で表される構造を有する3-ニトロベンジルアルコールを反応させて、以下の式(X7) :

【0059】  
【化14】

【0062】次いで、水素化ホウ素ナトリウム、塩化第一スズ等の還元剤、またはこれらの混合剤を用いるか、ロジウム炭素又はラネーニッケル等の触媒の存在下、接触水素還元で、式(X7)の化合物のニトロ基を還元し、以下の式(X8) :

【0063】  
【化15】

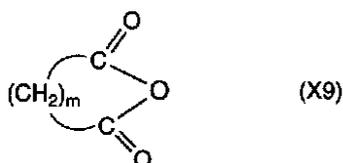
【0064】で表される構造を有する2-(2,2-ジクロロビニル)-3,3-ジメチルシクロプロパンカルボン酸 3-アミノベンジルを得る。

【0065】反応は、0 から溶媒の沸点の温度、好ましくは10 から80 で、5分から20時間、好ましくは30分から3時間行う。

【0066】最後に、式(X8)の化合物を有機塩基例えばピリジンの存在下、有機溶媒中又は有機塩基を溶媒として用い、以下の式(X9)：

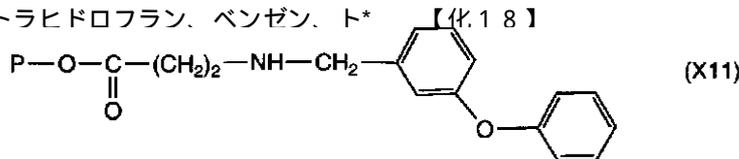
【0067】

【化16】



【0068】[式(X9)中、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と反応させることにより、式(1)の化合物を得ることができる。有機溶媒としては、例えば、アセトニトリル、ジクロロメタ

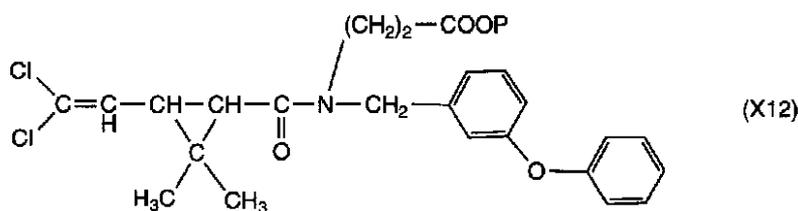
ン、クロロホルム、テトラヒドロフラン、ベンゼン、ト\*



【0075】[式(X11)中、P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。

【0076】反応は、エタノール等の有機溶媒中、0 から溶媒の沸点の温度、好ましくは10 から100

で、5分から30時間、好ましくは30分から20時間 30 行う。



【0079】[式(X12)中、P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。

【0080】式(X12)の化合物の合成のための有機 40 溶媒及び塩基としては、式(X5)の化合物の合成について上述したと同様のものを用いることができる。反応は、0 から溶媒の沸点の温度、好ましくは20 から80 で、5分から10時間、好ましくは30分から3時間行う。

【0081】最後に、式(X12)の化合物より、カルボキシル基の保護基P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、上述したようなアルカリ加水分解、酸加水分解等の公知の方法で行うことができる。

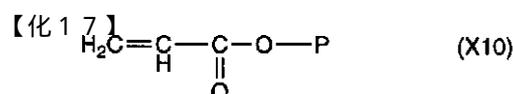
\*ルエン、ジエチルエーテル等を挙げることができる。

【0069】反応は、0 から溶媒の沸点の温度、好ましくは30 から100 で、5分から10時間、好ましくは30分から3時間行う。

【0070】II. 式(2)の化合物の一般的製造方法式(2)で表されるペルメトリンハブテンは、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、式(2)においてn=2の化合物は、以下のような方法を用いて合成することができる。

10 【0071】先ず、例えば特開昭54-163534号の明細書に記載の方法で合成することのできる3-フェノキシベンジルアミンに、以下の式(X10)：

【0072】



【0073】[式(X10)中、Pは先に定義した通りである]で表される構造を有するアクリル酸誘導体を反応させて、以下の式(X11)：

20 【0074】

【化18】

【0077】次いで、式(X11)の化合物に、有機溶媒中、塩基の存在下、上記式(X4)の化合物を反応させて、以下の式(X12)：

【0078】

30 【化19】

【0082】n=2以外の式(2)の化合物についても、公知の方法を用いて合成することが可能である。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。

【0083】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。

【0084】ペルメトリンハブテンと高分子化合物との 50 結合体の作製

上述のように合成されたペルメトリンハプ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。

【0085】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。

【0086】ペルメトリンハプ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。

【0087】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、ハプ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。

【0088】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）、ジオキサソ等が使用できる。反応に使用するハプテン化合物と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。

【0089】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、当該アミノ基とハプ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、ペルメトリンハプテンと高分子化合物との結合体を得ることができる。

【0090】一方、混合酸無水物法において用いられる酸無水物は、通常シヨッテン-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

とするハプテン-高分子化合物結合体が製造される。シヨッテン-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、シヨッテン-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ソ、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化炭化水素類としては、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プテンとハロゲン化炭化水素類の使用割合は、広い範囲から適宜選択され得る。

【0091】また、上記と同様の方法により、酵素等の標識物質をペルメトリンハプ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、<sup>32</sup>P、<sup>125</sup>I等の放射性物質、化学発光物質などがある。

#### 【0092】ポリクローナル抗体の作製

ペルメトリ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、ペルメトリンハプテンと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。

【0093】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。

【0094】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、ペルメトリ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。

【0095】本発明においてペルメトリ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法において約0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ないし約10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度でペルメトリンと反応できる(実施例8、図1-2)。

#### 【0096】モノクローナル抗体の作製

ペルメトリ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。

【0097】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ペルメトリ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。

【0098】以下、本発明のペルメトリ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。

【0099】(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。

【0100】(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臓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。

【0101】(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-Ag4-1(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等の骨髓腫株化細胞、あるいはラット由来の210.RCY3.Ag1.2.3.(Y3)(Nature, 277, 131-133, (1979))等を使用できる。

【0102】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 $1 \times 10^6$ 以上の細胞数を確保する。

【0103】(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。

【0104】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。

【0105】(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、ペルメトリンに対する抗体活性を測定する。

【0106】さらに、測定によりペルメトリ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。

【0107】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、抗ペルメトリ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。

【0108】(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。

【0109】これらにより得られた培養上清液あるいは腹水液を抗ペルメトリ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ペルメトリ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。

【0110】以上のようにして得られた抗ペルメトリ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。

#### 【0111】抗体によるペルメトリンの測定

本発明で使用する抗体によるペルメトリ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、プラーク法、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。

【0112】ペルメトリンの測定は、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。

【0113】(a)まず、固相化用抗原であるペルメトリ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。

【0114】(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。

【0115】(c)これに各種濃度のペルメトリ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ペルメトリンに競合的に反応させて、固相化抗原-抗体複合体及び、ペルメトリン-抗体複合体を生成させる。

【0116】(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ペルメトリンの量を決定することができる。

【0117】(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。

【0118】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0.01μg/mlから100μg/ml程度、好ましくは0.05μg/mlから5μg/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、300μl/ウェル以下で20μl/ウェルから150μl/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。

【0119】なお、担体に固相化させる抗原としては、抗体を作製したペルメトリ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)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、m又はn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。あるいは、抗体作製用として式(1)の化合物を用い、固相化抗原として式(2)の化合物を用いてもよい。さらに、式(1)及び(2)のいずれにも含まれない他のペルメトリン類似化合物を固相化抗原として使用することも可能である。

【0120】(b)工程のブロッキングは、抗原(ペルメトリ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、ペルメトリ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ます。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

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60mMNaCl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。

【0121】次いで(c)工程において、ペルメトリ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ペルメトリンと反応させることにより、固相化抗原-抗体複合体及びペルメトリン-抗体複合体が生成する。

【0122】この際、抗体としては、第一抗体として本願発明のペルメトリ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。

【0123】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。

【0124】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。

【0125】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ペルメトリンの量を算出することができる。

【0126】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。

【0127】ペルメトリ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。既知の濃度のペルメトリ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、試料中のペルメトリンの濃度を算出できる。

【0128】あるいはペルメトリンの測定は、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。

【0129】(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。

(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。

【0130】(c)上記工程とは別に、各種濃度のペルメトリンを含む試料に、ペルメトリ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。

【0131】(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ペルメトリンの量を決定する。

【0132】(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。

【0133】(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ペルメトリ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ELISA法と同様のものを使用できる。

【0134】(c)工程において用いる酵素結合ハプテンの調製は、ペルメトリ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ができる。調製した酵素結合ハプテンは、ペルメトリンを含む試料と混合する。

【0135】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ELISA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ペルメトリ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、m又はnが抗体作製用と相違する化合物を、標識用抗原として使用することもできる。あるいは、抗体作製用として式(1)の化合物を用い、標識用化合物として式(2)の化合物を用いてもよい。さら

に、式(1)及び(2)のいずれにも含まれない他のペルメトリン類似化合物も、標識用抗原として使用可能である。

【0136】(d)工程においてペルメトリ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、ペルメトリ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。ペルメトリ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PBSを使用することができる。

【0137】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ペルメトリンの量を算出することができる。

【0138】本発明のモノクローナル抗体PMT204は、間接競合ELISA法において好ましくは、約10ng/mlから約10,000ng/mlの濃度範囲でペルメトリンと反応する(実施例10、図2)。さらに、本発明のモノクローナル抗体PMT3及びPMT54は、間接競合ELISA法において好ましくは、約100ng/mlから約10,000ng/mlの濃度範囲でペルメトリンと反応する(実施例10、図2)。

【0139】さらに、前述したように間接競合ELISA法又は直接競合ELISA法において抗体作製用と異なるハプテンを固相化抗原又は標識用抗原として使用でき、その組み合わせによってELISA法において固有の反応性を示す。例えば、本願発明のモノクローナル抗体PMT54は、式(1)の化合物に含まれるペルメトリンハプテン-1を抗体作製用抗原として得られた抗体である。後述する実施例13では、式(2)の化合物に含まれるペルメトリンハプテン-4を固相化抗原として

用いたが、この場合、ペルメトリンとの反応性が高くなり、約10ng/mlから約10,000ng/mlの濃度範囲でペルメトリンと反応した(実施例13、図4)。

#### 【0140】本発明の抗体の交差反応性

上述した直接競合ELISA法又は間接競合ELISA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。

【0141】例えば、モノクローナル抗体PMT204は、アレスリンに6.7%、テトラメトリンに7.1%の交差反応性を示すほかは、ほとんど反応性を示さず、ペルメトリンに対して高い特異性を有する(実施例12、表6及び7)。また、PMT54は、ペルメトリン以外にも、アレスリン、ピレトリン、テトラメトリン、フェノトリン等に高い交差反応性を示す。特に、アレスリンとピレトリンの交差反応性は、1800%及び660%とペルメトリンより高く、PMT54とペルメトリンハプテン-4を用いたヘトロログスな間接競合ELISA法はペルメトリンよりむしろアレスリンとピレトリンの測定に適していると考えられる(実施例15、表8及び9)。

#### 【0142】本発明の抗体のメタノール耐性

農産物中などに残留するペルメトリンを測定する場合、それからの有機溶媒抽出物が被験試料となることがある。本発明の抗体は、このような有機溶媒を含有する被験試料を用いて免疫学的測定方法を行う場合でも、メタノール等の有機溶媒の影響を受けにくい。例えば、本発明のモノクローナル抗体PMT204及びPMT54は、ELISAの競合反応時の溶液に最終濃度で約0%-40%のメタノールを含む場合、メタノールの濃度に依存して反応性が低くなるものの、ほぼ同じ測定範囲でペルメトリンと反応することが可能である(実施例11及び14、図3及び5)。

【0143】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。

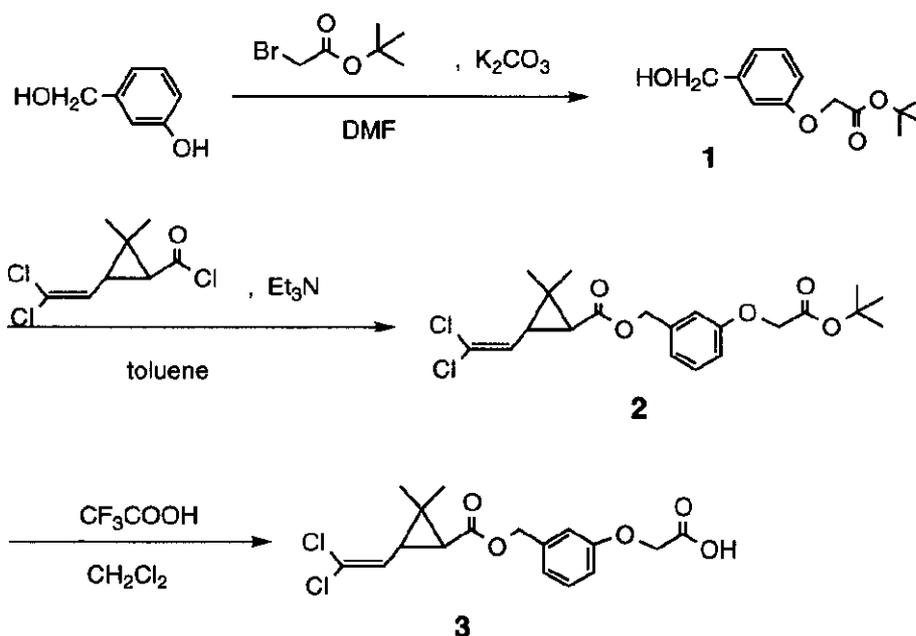
#### 【0144】

#### 【実施例】実施例1 ペルメトリンハプテン-1の合成

#### 【0145】

#### 【化20】

## 実施例1 反応式



## 【0146】2-(3-ヒドロキシメチルフェノキシ)酢酸 tert-ブチル(1)の合成

N,N-ジメチルホルムアミド20ml中の3-ヒドロキシベンジルアルコール2.5g(20mmol)、2-ブロモ酢酸tert-ブチル4.7g(24mmol)および炭酸カリウム3.0g(22mmol)の懸濁液を100で1時間攪拌した。反応混合物をトルエン50mlで2回抽出し、トルエン層を水洗後、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン：酢酸エチル=2：1)で精製し、4.4g(収率92%)の(1)を得た。

## 【0147】2-(2,2-ジクロロピニル)-3,3-ジメチルシクロプロパンカルボン酸 3-(2-オキソ-2-tert-ブトキシエトキシ)ベンジル(2)の合成

クロロホルム15ml中の2-(2,2-ジクロロピニル)-3,3-ジメチルシクロプロパンカルボン酸1.7g(8.0mmol)の溶液に塩化チオニル2.2g(20mmol)を加え、この混合物を1時間攪拌環流、濃縮した。残渣に30mlのトルエンおよび2-(3-ヒドロキシメチルフェノキシ)酢酸tert-ブチル2.0g(8.4mmol)を加え、この溶液にトリエチルアミン0.89g(8.8mmol)を5ないし10で加えて、室温で3時間攪拌した。反応混合物に50mlのトルエンを加え、トルエン層を水洗後、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン：酢酸エチル=5：1)で精製し、2.2g(収率65%)の(2)を得

た。

## 【0148】3-[2-(2,2-ジクロロピニル)-3,3-ジメチルシクロプロパンカルボニルオキシメチル]フェノキシ酢酸(3)の合成

ジクロロメタン25ml中の2-(2,2-ジクロロピニル)-3,3-ジメチルシクロプロパンカルボン酸 3-(2-オキソ-2-tert-ブトキシエトキシ)ベンジル(2)1.1g(4.5mmol)にトリフルオロ酢酸2.5mlを加え、室温で1時間攪拌した。反応混合物を濃縮後、残渣をカラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン：酢酸エチル=2：1)で精製し、1.2g(収率92%)の(3)を得た。

【0149】上記ペルメトリンハプテン-1(3)の<sup>1</sup>H-NMRによる物性データ(ケミカルシフト)を以下に示す。

【0150】

【表1】

【0151】

<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-D<sub>6</sub>, 400MHz)

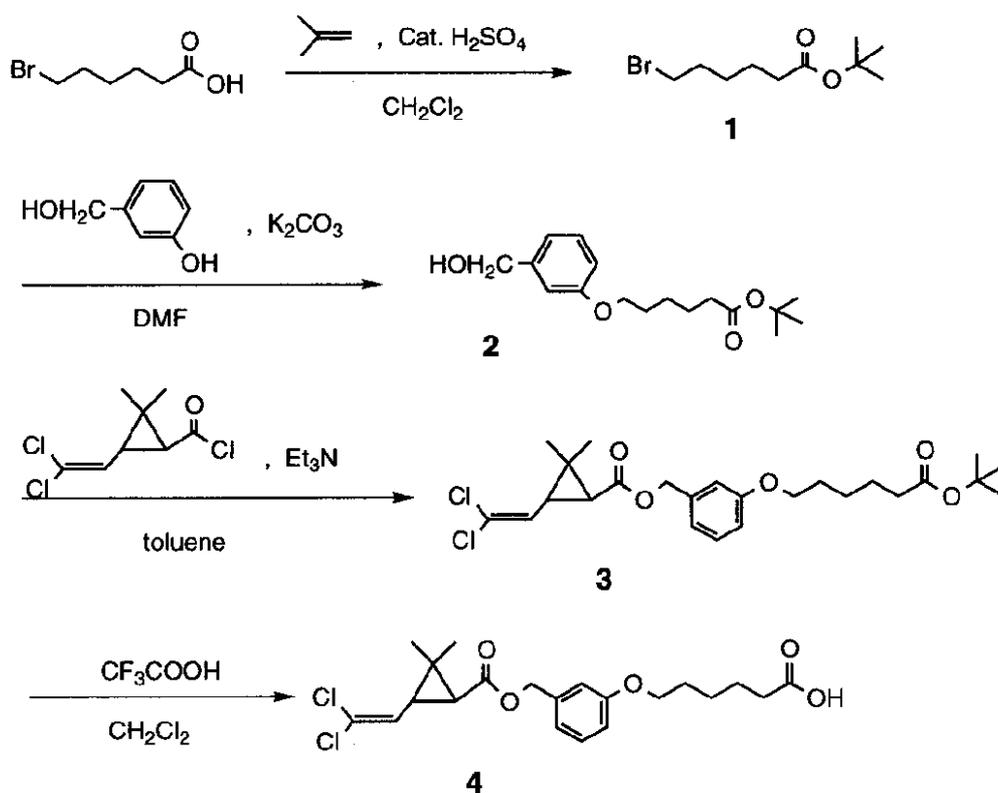
1.21(6H, m, 2CH<sub>3</sub>), 2.00, 2.08(2H, m, m, 2CH), 4.68(2H, s, OCH<sub>2</sub>CO), 5.07(2H, m, OCH<sub>2</sub>), 6.05, 6.28(1H, d, m, CH), 6.87(1H, m, Ar:H), 6.94(2H, m, 2Ar:H), 7.29(1H, t, Ar:H)

## 実施例2 ペルメトリンハプテン-2の合成

【0152】

【化21】

## 実施例2 反応式



## 【0153】6-プロモヘキサン酸tert-ブチル(1)の合成

ジクロロメタン200ml中の6-プロモヘキサン酸1.7g(60mmol)および濃硫酸0.6mlの混合液にイソブテン5.0g(80mmol)を-15で吹き込んだ。マイナス15で1時間、室温で15時間攪拌した後、反応混合物に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、激しく攪拌し、ジクロロメタン層を水洗後、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン：酢酸エチル=20:1)で精製し、7.2g(収率47%)の(1)を得た。

## 【0154】6-(3-ヒドロキシメチルフェノキシ)ヘキサン酸tert-ブチル(2)の合成

N,N-ジメチルホルムアミド15ml中の3-ヒドロキシベンジルアルコール1.2g(10mmol)、6-プロモヘキサン酸tert-ブチル(1)2.8g(11mmol)および炭酸カリウム1.5g(11mmol)の懸濁液を100で2時間攪拌した。反応混合物をトルエン50mlで2回抽出し、トルエン層を水洗後、硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン：酢酸エチル=2:1)で精製し、2.1g(収率72%)の(2)を得た。

## 【0155】2-(2,2-ジクロロビニル)-3,3-ジメチルシクロプロパンカルボン酸3-(6-オキ

## ソ-6-tert-ブトキシヘキシルオキシ)ベンジル(3)の合成

クロロホルム15ml中の2-(2,2-ジクロロビニル)-3,3-ジメチルシクロプロパンカルボン酸1.3g(6.2mmol)の溶液に塩化チオニル1.3g(13mmol)を加え、この混合物を1時間攪拌環流後、濃縮した。残渣にトルエン15ml中の6-(3-ヒドロキシメチルフェノキシ)ヘキサン酸tert-ブチル(2)1.8g(6.2mmol)を加え、この溶液にトリエチルアミン0.69g(6.8mmol)を5ないし10で加えて、室温で3時間攪拌した。反応混合物に50mlのトルエンを加え、トルエン層を水洗後、硫酸マグネシウムで乾燥、濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン：酢酸エチル=5:1)で精製し、2.5g(収率83%)の(3)を得た。

## 【0156】6-[3-(2-(2,2-ジクロロビニル)-3,3-ジメチルシクロプロパンカルボニルオキシ)メチル]フェノキシ]ヘキサン酸(4)の合成

ジクロロメタン50ml中の2-(2,2-ジクロロビニル)-3,3-ジメチルシクロプロパンカルボン酸3-(6-オキソ-6-tert-ブトキシヘキシルオキシ)ベンジル(3)1.5g(3.1mmol)にトリフルオロ酢酸3mlを加え、室温で1時間攪拌した。反応混合物を濃縮後、残渣をカラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン：酢酸エチル=2:1)で精製し、1.

2 g (収率93%)の(4)を得た。

【0157】上記ペルメトリンハプテン-2(4)の<sup>1</sup>H-NMRによる物性データ(ケミカルシフト)を以下に示す。

【0158】

【表2】

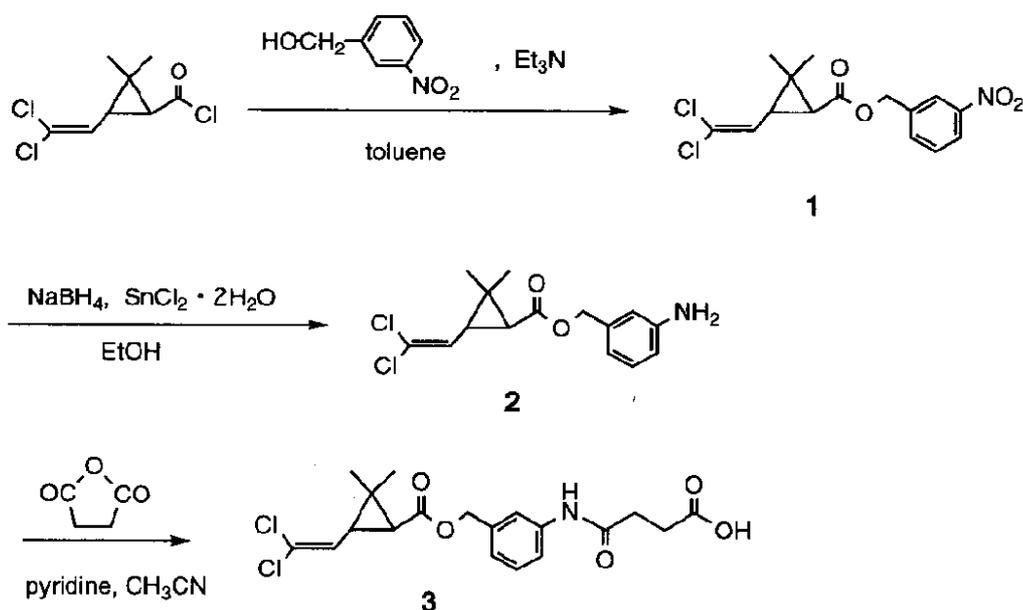
【0159】

<sup>1</sup>H-NMR(DMSO-D<sub>6</sub>, 400MHz)

1.21(6H, m, CH<sub>3</sub>), 1.42(2H,

m, CH<sub>2</sub>), 1.56(2H, m, CH), 1.7\*10

### 実施例3 反応式



2-(2,2-ジクロロビニル)-3,3-ジメチルシクロプロパンカルボン酸 3-ニトロベンジル(1)の合成

クロロホルム15ml中の2-(2,2-ジクロロビニル)-3,3-ジメチルシクロプロパンカルボン酸1.5g(7mmol)の溶液に塩化チオニル3g(25mmol)を加え、この混合物を5時間攪拌環流後、濃縮した。残渣をトルエン50mlに溶解し、この溶液に3-ニトロベンジルアルコール1.1g(7mmol)を加え、更にトリエチルアミン0.85g(8.4mmol)を5ないし10で加えて、室温で3時間攪拌した。反応混合物に50mlのトルエンを加え、トルエン層を水洗後、硫酸マグネシウムで乾燥、濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン:酢酸エチル=5:1)で精製し、2.1g(収率88%)の(1)を得た。

【0161】2-(2,2-ジクロロビニル)-3,3-ジメチルシクロプロパンカルボン酸 3-アミノベンジル(2)の合成

エタノール100ml中の2-(2,2-ジクロロビニル)-3,3-ジメチルシクロプロパンカルボン酸 3-ニトロベンジル(1)1.8g(5.2mmol)と

\*1(2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.00, 2.08(2H, m, m, 2CH), 2.23(2H, t, COCH<sub>2</sub>), 3.95(2H, t, OCH<sub>2</sub>), 5.07(2H, m, OCH<sub>2</sub>Ar), 6.02, 6.28(1H, d, d, CH), 6.90(3H, m, 3Ar:H), 7.27(1H, t, Ar:H), 12.03(1H, s, COOH)

実施例3 ペルメトリンハプテン-3の合成

【0160】

【化22】

塩化スズ(II)二水和物5.9g(26mmol)の溶液にエタノール30ml中の90%水素化ほう素ナトリウム0.11g(2.6mmol)を60で加え、更に30分間攪拌した。反応混合物に5ないし10で100mlの冷水を加え、次に3.5Nのカセイソーダ水溶液をpH7になるまで加えた。エタノールを減圧留去し、ジエチルエーテル30mlで3回抽出した。エーテル層を水洗後、硫酸マグネシウムで乾燥、濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン:酢酸エチル=3:1)で精製し、1.1g(収率69%)の(2)を得た。

【0162】3-[2-(2,2-ジクロロビニル)-3,3-ジメチルシクロプロパンカルボニルオキシメチル]フェノキシ]スクシニアニリド酸(3)の合成

ピリジン10ml中の2-(2,2-ジクロロビニル)-3,3-ジメチルシクロプロパンカルボン酸 3-アミノベンジル(2)0.8g(2.5mmol)の溶液にアセトニトリル25ml中の無水こはく酸0.29g(2.9mmol)を加え、この混合物を50で1.5時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、残渣に30mlの水を加え、30mlの酢酸エチルで3回抽出した。酢酸エチル層を水洗後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、

濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（*n*-ヘキサン：酢酸エチル = 1 : 2）で精製し 0.9 g（収率 90%）の (3) を得た。

【0163】上記ペルメトリンハブテン-3 (3) の<sup>1</sup>H-NMRによる物性データ（ケミカルシフト）を以下に示す。

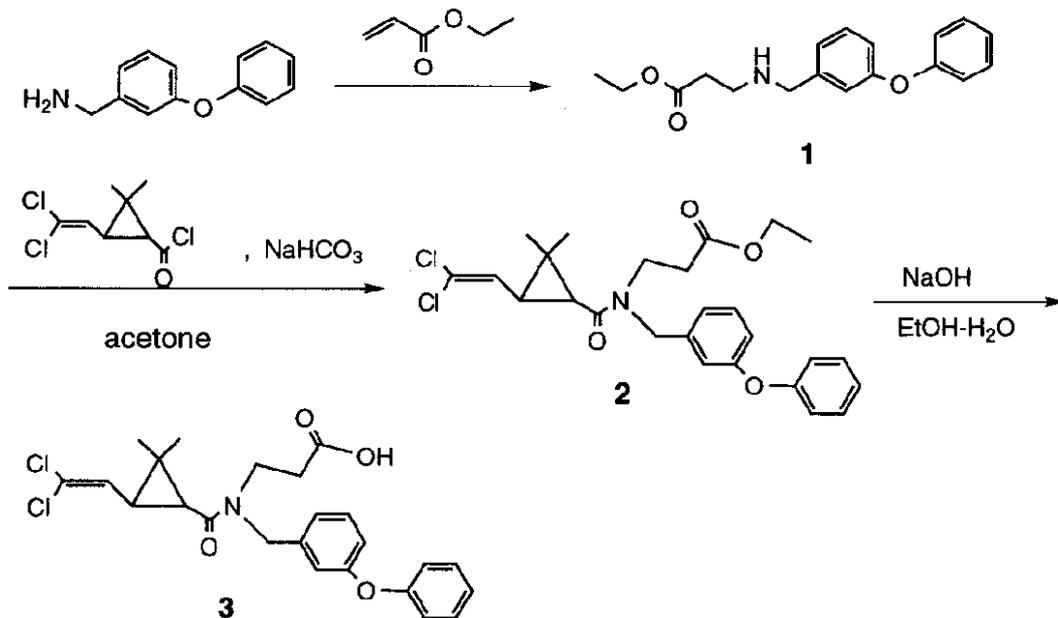
【0164】

【表3】

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-D<sub>6</sub>, 400MHz)

1.21 (6H, m, 2CH<sub>3</sub>) 2.04 (2H, \*10

**実施例4 反応式**



3-(3-フェノキシベンジルアミノ)プロピオン酸 エチル(1)の合成

エタノール 10 ml 中のアクリル酸 0.7 g (7 mmol) の溶液に 3-フェノキシベンジルアミン 1.5 g (7.5 mmol) を加え、この混合物を室温で 16 時間攪拌後、濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー（酢酸エチルで溶出）で精製し、0.62 g（収率 28%）の (1) を得た。

【0166】N-[2-(2,2-ジクロロビニル)-3,3-ジメチルシクロプロパンカルボニル], N-(3-フェノキシ)ベンジル]3-アミノプロピオン酸 エチル(2)の合成

クロロホルム 5 ml 中の 2-(2,2-ジクロロビニル)-3,3-ジメチルシクロプロパンカルボン酸 0.3 g (1.4 mmol) の溶液に塩化チオニル 0.5 g (4.6 mmol) を加え、この混合物を 5 時間攪拌環流、濃縮した。残渣を 1 ml のアセトンに溶かし、アセトン 5 ml 中の 3-(3-フェノキシベンジルアミノ)プロピオン酸 エチル(1) 0.45 g (1.5 mmol) および炭酸水素ナトリウム 0.15 g (1.8 mmol) の混合物に室温で滴下し、更に 2 時間攪拌した。

\*m, 2CH), 2.55 (4H, m, 2CH<sub>2</sub>), 5.06 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 6.06, 6.29 (1H, d, d, =CH), 7.02 (1H, d, Ar:H), 7.29 (1H, t, Ar:H), 7.52 (1H, d, Ar:H), 7.67 (1H, s, Ar:H), 10.03 (1H, s, NH), 12.15 (1H, br, COOH)

実施例4 ペルメトリンハブテン-4の合成

【0165】

【化23】

反応混合物を濃縮後、残渣を酢酸エチル (30 ml) で 3 回抽出し、有機層を水洗後、硫酸マグネシウムで乾燥、濃縮した。残渣をカラムクロマトグラフィー（*n*-ヘキサン：酢酸エチル = 4 : 1）で精製し、0.56 g（収率 77%）の (2) を得た。

【0167】N-[2-(2,2-ジクロロビニル)-3,3-ジメチルシクロプロパンカルボニル], N-(3-フェノキシ)ベンジル]3-アミノプロピオン酸(3)の合成

エタノール 5 ml 中の N-[2-(2,2-ジクロロビニル)-3,3-ジメチルシクロプロパンカルボニル], N-(3-フェノキシ)ベンジル]3-アミノプロピオン酸 エチル(2) 0.49 g (1 mmol) の溶液に、水 3 ml 中の水酸化ナトリウム 0.4 g (10 mmol) の溶液を加え、室温で 1 時間攪拌した。減圧下にエタノールを留去し、残渣を 1 N 塩酸で酸性にし、酢酸エチルで抽出した (30 ml x 3)。酢酸エチル層を水洗し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（*n*-ヘキサン：酢酸エチル = 1 : 1）で精製し 0.28 g（収率 61%）の (3) を得た。

【0168】上記ペルメトリンハプテン - 4 (3) の<sup>1</sup>H - NMRによる物性データ(ケミカルシフト)を以下に示す。

【0169】

【表4】

<sup>1</sup>H - NMR (DMSO - D<sub>6</sub>, 400 MHz)  
0.95, 1.19 (6H, m, 2CH<sub>3</sub>), 2.11 (2H, m, 2CH), 2.48 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 3.54 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 4.50 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 6.21 (1H, m, CH), 6.84 (1H, d, J = 6.8 Hz, Ar : H), 6.92 (1H, m, Ar : H), 6.99 (3H, m, 3 Ar : H), 7.15 (1H, m, Ar : H), 7.38 (3H, m, 3 Ar : H), 12.34 (1H, s, COOH)

実施例5 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、ペルメトリンハプテンとKLH又はBSAとの結合体を活性化エステル法を用いて作製した。

【0170】実施例1ないし実施例4で作製したペルメトリンハプテン - 1ないし - 4の3.6 μmolを、DMSO 100 μlに溶解した。この溶液にN - ヒドロキシコハク酸イミド(16 μmol)を10 μlのDMSOに溶解した溶液、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(5.6 μmol)を20 μlのDMSOに溶解した溶液をそれぞれ加えた。室温にて1.5時間反応させた後、この反応溶液にBSA又はKLH 10 mgを85 mMホウ酸緩衝液(pH 8.0) 500 μlに溶解後加え、再び室温にて1.5時間反応させた。反応終了後、ダルベッコのリン酸緩衝液(以下、PBS(-)と略す)で透析し、各ペルメトリンハプテンとKLHとの結合体(以下、各々、「ペルメトリンハプテン - 1 / KLH」ないし「ペルメトリンハプテン - 4 / KLH」と言う)、並びに各ペルメトリンハプテンとBSAとの結合体(以下、各々、「ペルメトリンハプテン - 1 / BSA」ないし「ペルメトリンハプテン - 4 / BSA」と言う)を各々調製した。

【0171】実施例6 免疫感作

免疫には、Balb / cマウス(8週令、メス)を用いた。実施例5で調製したペルメトリンハプテン - 1 / KLHないしはペルメトリンハプテン - 4 / KLHの100 μgを各々PBS(-) 50 μlに溶解し、等量のフロイント完全アジュバントと乳化混合した後、マウスの腹腔内に接種した。その1カ月後、初回免疫量の1 / 4量を追加免疫し、さらにその1週間後、マウスの尾静脈から採血し、得られた血清をポリクローナル抗体とした。また、さらにその2カ月後に追加免疫と同量を最終免疫した。

【0172】実施例7 : ポリクローナル抗体の抗体価

実施例6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法にてペルメトリンを測定し、抗血清を抗体価を調べた。

【0173】まず、免疫原と同一のペルメトリンハプテンを有する結合体(ペルメトリンハプテン - 1 / BSAないしはペルメトリンハプテン - 4 / BSA)を各々PBS(-)に溶解した溶液(4 μg / ml)を、96ウェルのマイクロタイタープレート(コーニング・コスター社製)の各ウェルに100 μl / ウェルに加え、4で1晩静置することによって固相化した。次に300 μl / ウェルでブロッキング緩衝液(1%BSAと60 mM NaClを添加した85 mMホウ酸緩衝液; pH 8.0)に置き換え、室温で1時間ブロッキングした。このウェルに希釈液(150 mM NaClを添加した85 mMホウ酸緩衝液; pH 8.0)で段階希釈した抗血清を加え、室温で1時間反応させた。洗浄液(60 mM NaClを添加した85 mMホウ酸緩衝液; pH 8.0)で3回洗浄した後、2次抗体希釈液(0.3%BSAと150 mM NaClを添加した85 mMホウ酸緩衝液; pH 8.0)で1000倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗マウスIgG抗体(カペル社製)を100 μl / ウェルで添加し、室温で1時間反応させた。再び、洗浄液で3回洗浄した後、ペルオキシダーゼの基質溶液(100 μg / mlの3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンチジン及び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)で10分間発色させ、1 N硫酸で反応停止後、450 nmの吸光度を測定した。

【0174】結果は、図1 - 1に示した通り、ペルメトリンハプテン - 1 / KLH由来のポリクローナル抗体の抗体価が最も高かった。

【0175】実施例8 : ポリクローナル抗体のペルメトリンとの反応性

実施例7で比較的抗体価の高かったペルメトリンハプテン - 1 / KLH、ペルメトリンハプテン - 3 / KLH、及びペルメトリンハプテン - 4 / KLH由来の各ポリクローナル抗体とペルメトリンとの反応性を、実施例7に記載の間接競合ELISA法を用いて調べた。

【0176】ペルメトリンハプテン - 1 / BSA、ペルメトリンハプテン - 3 / BSA、及びペルメトリンハプテン - 4 / BSAを各々固相化しブロッキングしたウェルに、希釈液で適当な濃度に希釈したペルメトリン溶液を加え、さらに先の間接競合ELISA法で生じた吸光度が抗原過剰域の半分になるように希釈した抗体溶液を加えて反応させた。次いで、上記の間接競合ELISA法と同様にして2次抗体と反応させた後、発色反応を行い、吸光度を測定した。

【0177】結果を、ペルメトリン未添加時の吸光度に対する阻害率とペルメトリン濃度の関係として図1 - 2

に示した。図1-2に示す通り、いずれの抗体もペルメトリンと約0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ないし10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度範囲で反応した。これらの抗体の内、最も抗体価の高かったペルメトリンハプテン-1/KLHを免疫したマウスを用いて、モノクローナル抗体の作製を試みた。

【0178】実施例9 モノクローナル抗体の作製  
モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得るための細胞融合は、実施例5の最終免疫後3日目のマウスの脾臓細胞を用いて行った。

【0179】まず、摘出した脾臓から、ダルベコ改変イーグル培地(以下、DMEMと略す)中に脾臓細胞を取り出し、DMEMにて3回洗浄した後、マウスのミエロ-マ細胞P3-X63-Ag8.653と細胞数の比で5:1(脾臓細胞:ミエロ-マ細胞)となるように混合し、遠心(1,200rpm、5分間)して細胞沈渣を集めた。この細胞沈渣に予め37に加温しておいた50%ポリエチレングリコール(分子量1500)1mlを加え、細胞を融合した。細胞融合は、DMEM10mlを徐々に添加し、牛胎児血清(以下、「FBS」と言う)1mlを更に添加することにより、停止した。融合した細胞は、DMEMに10%FBS、ヒポキサンチン(100 $\mu\text{M}$ )、アミノプテリン(0.4 $\mu\text{M}$ )、およびチミジン(16 $\mu\text{M}$ )を添加したHAT培地に懸濁後、96ウェルマイクロプレートの各ウェルに2 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞/ウェルで分注した。培養は、37、5%二酸化炭素存在下で行った。培養後、コロニーが生じたウェルの内、それらの培養上清中にペルメトリンと反応するモノクローナル抗体を産生しているものを、実施例7に示した間接競合ELISA法でスクリーニングした。

【0180】ペルメトリンとの反応性を示したウェル中のハイブリドーマについて、限界希釈法によって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ペルメトリン抗体を産生する細胞としてクローン化された(PMT3、PMT54、PMT204)。この内、PMT204を平成12年3月9日に、寄託番号FERM P-17773で工業技術院生命工学工業研究所(〒305-0046茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託した。

【0181】これらの細胞をFBSを10%添加したDMEM中で培養し、得られた培養上清を各々モノクローナル抗体として用いた。(以降、各モノクローナル抗体には、これらを産生するモノクローナル抗体産生細胞と同一名称を用いる。)

作製したモノクローナル抗体のサブクラスを以下の表5に示す。

【0182】

【表5】  
表5 作製したモノクローナル抗体のサブクラス

モノクローナル抗体	サブクラス
PMT 3	I g G 1
PMT 5 4	I g G 1
PMT 2 0 4	I g G 2 a

【0183】表5に示したとおり、PMT3とPMT54がI g G 1、PMT204はI g G 2 aであった。

【0184】実施例10:モノクローナル抗体とペルメトリンとの反応性

実施例9で得られたモノクローナル抗体とペルメトリンとの反応性について、実施例8に示した間接競合ELISA法を用いて調べた。その結果を図2に示す。

【0185】図2に示すように、PMT204が10ng/mlないし10,000ng/ml、PMT3、PMT54が100ng/mlないし10,000ng/mlの濃度範囲でペルメトリンと反応した。特に、PMT204は最も高感度にペルメトリンと反応した。

【0186】実施例11:モノクローナル抗体PMT204のメタノール耐性

農産物中などに残留するペルメトリンを測定する場合、それらからの有機溶媒抽出物が被検試料となる。そこで反応時の有機溶媒の影響を調べるため、実施例8に示した間接競合ELISA法を用いて、メタノールの影響を検討した。具体的には、競合反応時の溶液に、メタノールの最終濃度が0から60%となるように添加した。

【0187】図3に示したように、PMT204は、5%メタノールのとき最もペルメトリンとの反応性が高く、10%から40%メタノールまでは、濃度に依存して反応性が低くなるもののペルメトリンと反応した。

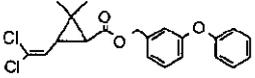
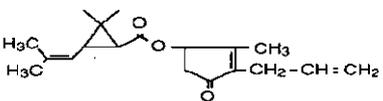
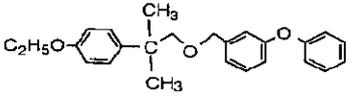
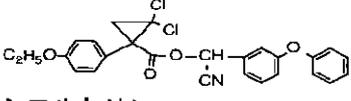
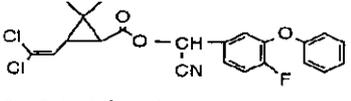
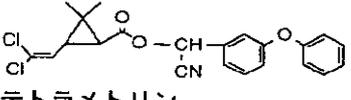
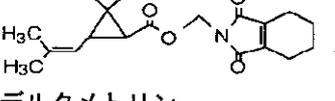
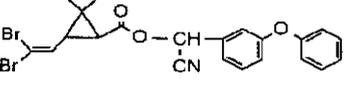
【0188】実施例12:PMT204とピレスロイド系殺虫剤との交差反応性

実施例8に示した間接競合ELISA法を用いて、PMT204とピレスロイド系殺虫剤との交差反応性を調べた。結果は、IC<sub>50</sub>値(反応を50%阻害する化合物の濃度)および交差反応率(ペルメトリンのIC<sub>50</sub>値/各化合物のIC<sub>50</sub>値 $\times$ 100)として表6及び7に示した。

【0189】

【表6】

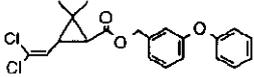
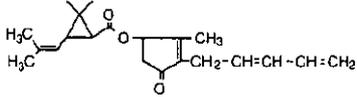
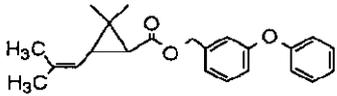
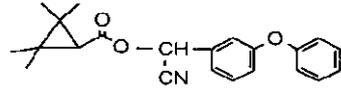
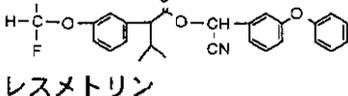
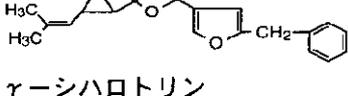
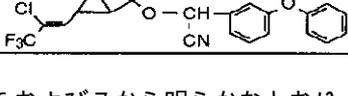
表6 <sup>36</sup> PMT204とピレスロイド系農薬との交差反応性

ピレスロイド系農薬	IC <sub>50</sub> (ng/ml)	交差反応率(%)
ベルメトリン 	320	100
アレスリン 	4,800	6.7
エトフェンプロックス 	>10,000	<3.2
シクロプロトリン 	>10,000	<3.2
シフルトリン 	>10,000	<3.2
シベルメトリン 	>10,000	<3.2
テトラメトリン 	4,500	7.1
デルタメトリン 	>10,000	<3.2

【0190】

【表7】

表7 PMT204とピレスロイド系農薬との交差反応性

ピレスロイド系農薬	IC <sub>50</sub> (ng/ml)	交差反応率(%)
ペルメトリン 	320	100
ピレトリン 	>10,000	<3.2
フェノトリン 	>10,000	<3.2
フェンプロパトリン 	>10,000	<3.2
フルシトリネート 	>10,000	<3.2
レスメトリン 	>10,000	<3.2
γ-シハロトリン 	>10,000	<3.2

【0191】表6および7から明らかとなり、PMT204は、アレスリンに6.7%、テトラメトリンに7.1%の交差反応性を示すほかは、すべて3.2%以下しか交差反応せず、ペルメトリンに高い特異性を持つことが明らかとなった。

【0192】実施例13：ヘテロロガスな間接競合ELISA法におけるPMT54とペルメトリンとの反応性  
実施例10でペルメトリンに反応性を示したモノクローナル抗体の内、PMT54は、ペルメトリンハプテン-1/BSAの代わりにペルメトリンハプテン-4/BSAを用いた間接競合ELISA法によって、ペルメトリンとの反応性が高くなり、図4に示すように測定範囲は10ng/mlないし10,000ng/mlとなった。

【0193】実施例14：モノクローナル抗体PMT54のメタノール耐性

実施例13に示したヘテロロガスな間接競合ELISA法を用いて、PMT54とペルメトリンとの反応性に及ぼすメタノールの影響を調べた。メタノールは、実施例11と同様に、競合反応時の溶液に最終濃度が0から60%となるように添加した。

【0194】図5に示したように、メタノール濃度の増加に依存して吸光度の減少は認められるものの、40%メタノールまでほぼ同じ測定範囲でペルメトリンと反応した。

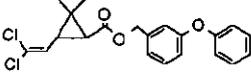
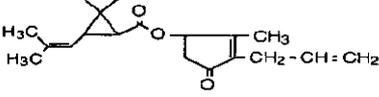
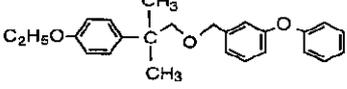
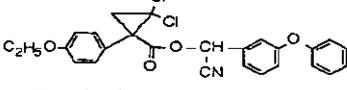
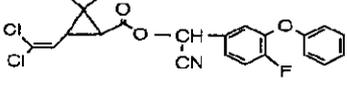
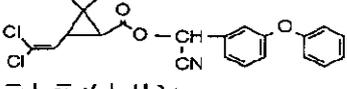
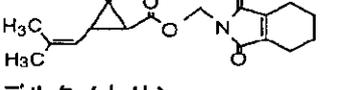
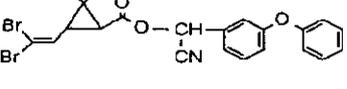
【0195】実施例15：PMT54とピレスロイド系殺虫剤との交差反応性

実施例12と同様にして、PMT54についてもピレスロイド系殺虫剤との交差反応性を調べた。結果を表8および9に示す。

【0196】

【表8】

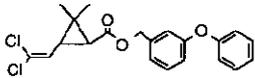
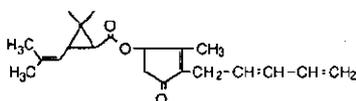
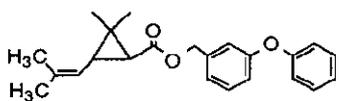
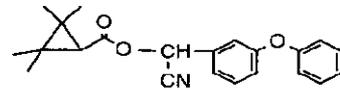
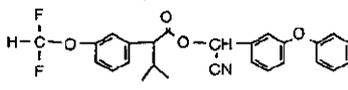
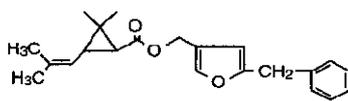
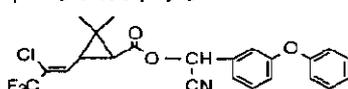
表8 <sup>20</sup> PMT54とピレスロイド系農薬との交差反応性

ピレスロイド系農薬	IC <sub>50</sub> (ng/ml)	交差反応率(%)
ペルメトリン 	360	100
アレスリン 	20	1800
エトフェンプロックス 	>10,000	<3.6
シクロプロトリン 	>10,000	<3.6
シフルトリン 	7,200	5.0
シペルメトリン 	>10,000	<3.6
テトラメトリン 	460	78
デルタメトリン 	>10,000	<3.6

【0197】

【表9】

42  
表9 PMT54とピレスロイド系農薬との交差反応性

ピレスロイド系農薬	IC <sub>50</sub> (ng/ml)	交差反応率(%)
ペルメトリン 	360	100
ピレトリン 	55	660
フェノトリン 	620	59
フェンプロバトリン 	> 10,000	< 3.6
フルシトリネート 	> 10,000	< 3.6
レスメトリン 	1,500	24
ギャーシハロトリン 	> 10,000	< 3.6

【0198】表8および9から明らかとなり、PMT54は、ペルメトリン以外にも、アレスリン、ピレトリン、テトラメトリン、フェノトリン等に高い交差反応性を示した。特に、アレスリンとピレトリンの交差反応性は、1800%及び660%とペルメトリンより高く、PMT54とペルメトリンハプテン-4を用いた間接競合ELISA法はペルメトリンよりむしろアレスリンとピレトリンの測定に適している可能性があると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明のポリクローナル抗体の抗体価（図1-1）及びペルメトリンとの反応性（図1-2）

を示す。

【図2】図2は、本発明のモノクローナル抗体とペルメトリンとの反応性を示す。

【図3】図3は、本発明のモノクローナル抗体PMT204とペルメトリンとの反応性に対するメタノールの影響を示す。

【図4】図4は、ヘテロロガスな間接競合ELISA法における本発明のモノクローナル抗体PMT54とペルメトリンとの反応性を示す。

10 【図5】図5は、ヘテロロガスな間接競合ELISA法における本発明のモノクローナル抗体PMT54とペルメトリンとの反応性に及ぼすメタノールの影響を示す。

【図1】

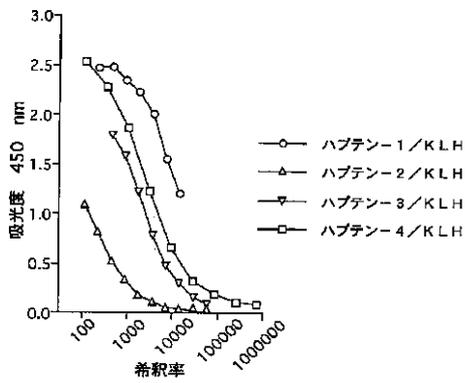


図1-1 ポリクローナル抗体の抗価

【図2】

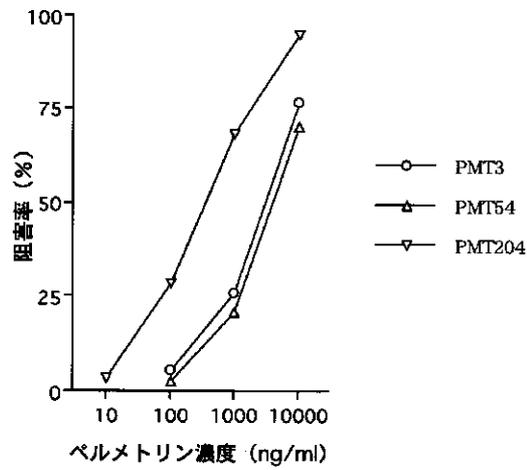


図2 モノクローナル抗体とベルメトリンとの反応性

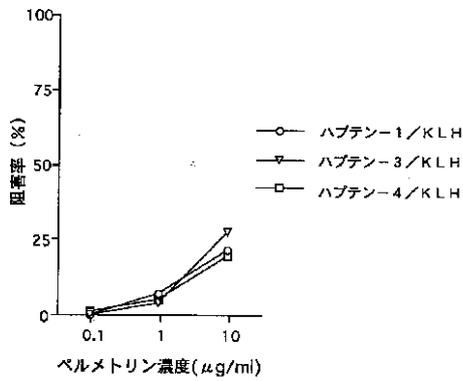


図1-2 ポリクローナル抗体とベルメトリンとの反応性

【図4】

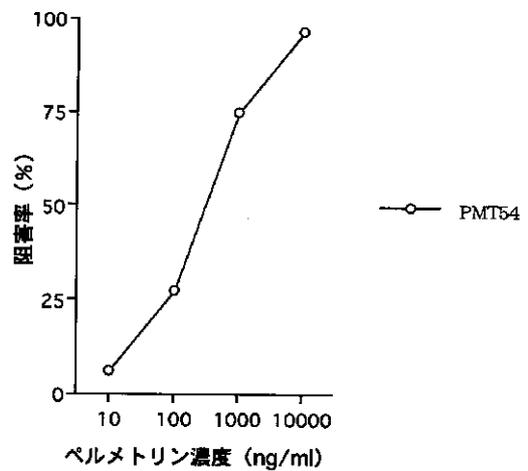


図4 ヘテロガスな間接競合ELISA法におけるPMT54とベルメトリンとの反応性

【図3】

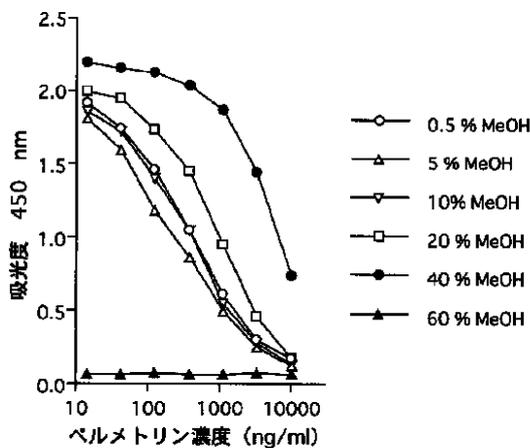


図3 PMT204とベルメトリンとの反応性に及ぼすメタノールの影響

【図5】

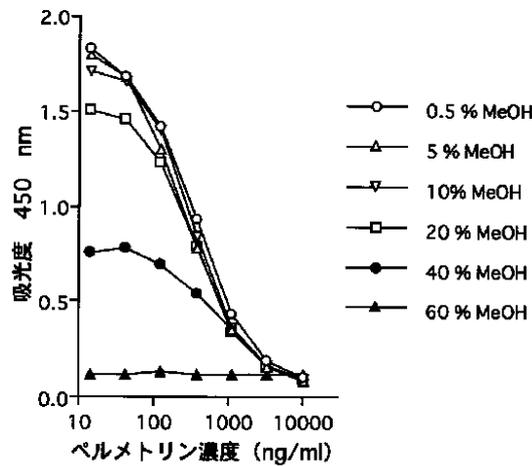


図5 ヘテロガスな間接競合ELISA法におけるPMT54とペルメトリンとの反応性及ばすメタノールの影響

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-コード <sup>*</sup> (参考)
C 1 2 N 15/02		G 0 1 N 33/53	G
C 1 2 P 21/08		33/577	B
G 0 1 N 33/53		C 1 2 R 1:91)	
33/577		(C 1 2 P 21/08	
//(C 1 2 N 5/10		C 1 2 R 1:91)	
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 N 5/00	B
(C 1 2 P 21/08		15/00	C
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 R 1:91)	

(72)発明者 山口 優樹  
 東京都港区芝浦4丁目9番25号 株式会社  
 環境免疫技術研究所内

Fターム(参考) 4B024 AA05 AA07 AA11 AA17 BA53  
 GA03 HA15  
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA10  
 DA12 DA13 DA16  
 4B065 AA92X AB05 AC14 BA08  
 CA25 CA41 CA46 CA48 CA54  
 4H006 BJ20 BM10 BM73 BP30 BP60  
 BV36 BV62 FC74  
 4H045 AA11 BA72 CA40 DA75 DA76  
 DA86 EA50 FA41 FA72

(72)発明者 大出 勝也  
 東京都港区芝浦4丁目9番25号 株式会社  
 環境免疫技術研究所内

专利名称(译)	苯氯菊酯的化合物，抗体和测量方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2001278844A</a>	公开(公告)日	2001-10-10
申请号	JP2000091132	申请日	2000-03-29
申请(专利权)人(译)	株式会社环境免疫技术研究所		
[标]发明人	伊東茂壽 三宅司郎 山口優樹 大出勝也		
发明人	伊東 茂壽 三宅 司郎 山口 優樹 大出 勝也		
IPC分类号	G01N33/53 C07C69/747 C07C233/25 C07C233/63 C07K16/44 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/577		
FI分类号	C07C69/747.T C07C233/25 C07C233/63 C07K16/44 C12P21/08 G01N33/53.G G01N33/577.B C12R1/91 C12N5/00.B C12N15/00.C C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA05 4B024/AA07 4B024/AA11 4B024/AA17 4B024/BA53 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA10 4B064/DA12 4B064/DA13 4B064/DA16 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA41 4B065/CA46 4B065/CA48 4B065/CA54 4H006/BJ20 4H006/BM10 4H006/BM73 4H006/BP30 4H006/BP60 4H006/BV36 4H006/BV62 4H006/FC74 4H045/AA11 4H045/BA72 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA41 4H045/FA72		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

(有纠正) 要解决的问题: 提供与苯氯菊酯或其片段反应的新型抗体及其制备方法, 与苯氯菊酯具有反应性的单克隆抗体, 构成用于产生新抗体的抗原的半抗原化合物(苯氯菊酯半抗原)和高分子化合物和产生抗体或其片段的杂交瘤。 溶液: 通式1或2的化合物

