

(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2006-282547  
(P2006-282547A)

(43) 公開日 平成18年10月19日(2006.10.19)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>CO7D 213/61</b> (2006.01)	CO7D 213/61 CSP	4B065
<b>GO1N 33/53</b> (2006.01)	GO1N 33/53 S	4C055
<b>GO1N 33/577</b> (2006.01)	GO1N 33/577 B	4H011
<b>CO7K 16/44</b> (2006.01)	CO7K 16/44	4H045
<b>C12N 5/10</b> (2006.01)	C12N 5/00 B	

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-102687 (P2005-102687)	(71) 出願人	000155023 株式会社堀場製作所
(22) 出願日	平成17年3月31日 (2005.3.31)		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

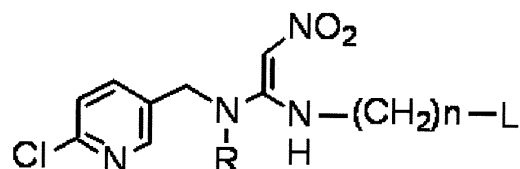
(54) 【発明の名称】 ニテンピラムのハプテン化合物、抗体、ハイブリドーマ、およびその測定手段、測定用キットまたは測定方法

(57) 【要約】

【課題】 ニテンピラムに対して高感度、かつ選択性の高い抗体を作製するためのハプテン化合物、およびニテンピラムに対する抗体、ならびに当該抗体を用いた高感度かつ定量性に優れたニテンピラムの免疫学的測定手段、測定用キットおよび免疫学的測定方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 下記式(1)：

【化1】



(式中、Rは炭素数1～5のアルキル基、Lはカルボキシル基、アミノ基、アルデヒド基およびヒドロキシル基を、nは1～10の整数を表す)

で表わされる構造を有する化合物。

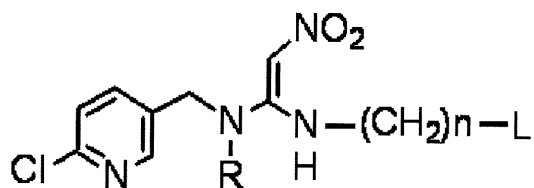
【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記式(1)：

## 【化 1】



10

(式中、Rは炭素数1～5のアルキル基、Lはカルボキシル基、アミノ基、アルデヒド基およびヒドロキシル基を、nは1～10の整数を表す)

で表わされる構造を有する化合物。

## 【請求項 2】

前記Rがエチル基、Lがカルボキシル基、nが3である請求項1記載の化合物。

## 【請求項 3】

請求項1または2記載の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り得られるニテンピラムに対する抗体またはそのフラグメント。

## 【請求項 4】

前記抗体がモノクローナル抗体である請求項3記載の抗体またはそのフラグメント。

20

## 【請求項 5】

請求項3または4記載の抗体またはそのフラグメントを産生するハイブリドーマ。

## 【請求項 6】

前記ハイブリドーマがNPR-1H12-15である請求項5記載のハイブリドーマ。

## 【請求項 7】

請求項3または4記載の抗体またはそのフラグメントを含んでなるニテンピラムの測定手段。

## 【請求項 8】

請求項3または4記載の抗体またはそのフラグメントを含むニテンピラムの測定用キット。

30

## 【請求項 9】

請求項3または4記載の抗体またはそのフラグメント、請求項7記載の測定手段または請求項8記載の測定キットを用いることを特徴とするニテンピラムの測定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ニテンピラム(化学名：(E)-N-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-ethyl-N'-methyl-2-nitrovinylidenediamine)のハプテン化合物、ニテンピラムに対する抗体、抗体を産生するハイブリドーマおよびその測定手段、測定用キットまたは測定方法に関する。

40

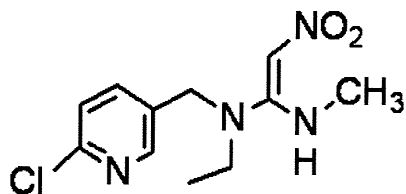
## 【背景技術】

## 【0002】

ニテンピラムは、以下の式(2)：

## 【0003】

## 【化2】



で表される構造を有するネオニコチノイド系の殺虫剤である。ウンカ・ヨコバイ類，アブラムシ類などの半翅目害虫に卓効を示し，優れた速効性，残効性及び浸透移行性を有している。

10

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。ニテンピラムについては、環境庁長官個別設定の農薬登録保留基準値が、例えば、みかん（0.5 ppm）、みかん以外のかんきつ類（2 ppm）、果実類（1 ppm）、第1果菜類（5 ppm）、第2果菜類（1 ppm）、第2葉菜類（5 ppm）、根・茎類（5 ppm）、いも類（0.2 ppm）などと定められている。よって、環境や食品に関する安全確保のためには、農作物、特に米に含有される、ニテンピラムの量を迅速かつ正確に測定することが必要である。

## 【0004】

従来、例えば農産物中のニテンピラムは、米、果実、野菜、いも類等から抽出し、精製した後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により分析され、その代謝物であるCPFをガスクロマトグラフィー（GC）で分析されてきた。即ち、試料をアセトニトリルで抽出し、多孔性ケイソウ土カラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製後、ニテンピラムをHPLCで測定し、CPFをGCで測定する方法が採用されている。この方法は、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。ニテンピラム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。

20

## 【0005】

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。具体的には、免疫原性キャリアタンパク質にコンジュゲートされたネオニコチノイドハブテンで動物を免疫化することによって産生されたポリクローナル抗体を用いたネオニコチノイド系殺虫剤の測定が試みられている（例えば特許文献1参照）。

30

【特許文献1】特表2003-516423号公報

## 【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

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な費用を必要とする等の問題点がある。ニテンピラム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。

40

## 【0007】

また、免疫学的測定法においても、上記の抗体は、反応性において十分な性能を持つが、ニテンピラムについては、その反応性を検討するに至っておらず、実用化の要請が強まっている。

## 【0008】

本発明の目的は、ニテンピラムに対して高感度、かつ選択性の高い抗体を作製するため

50

のハプテン化合物、およびニテンピラムに対する抗体、ならびに当該抗体を用いた高感度かつ定量性に優れたニテンピラムの免疫学的測定手段、測定用キットおよび免疫学的測定方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

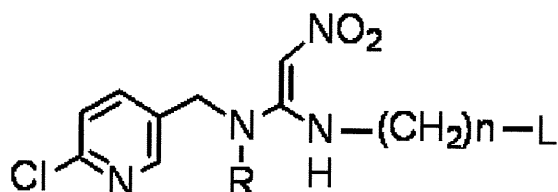
本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、以下に示すニテンピラムのハプテン化合物、抗体、ハイブリドーマ、測定手段および測定方法により前記目的を達成することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0010】

すなわち、本発明は、下記式(1)：

【0011】

【化1】



(式中、Rは炭素数1～5のアルキル基、Lはカルボキシル基、アミノ基、アルデヒド基およびヒドロキシル基を、nは1～10の整数を表す)で表わされる構造を有する化合物である。

【0012】

前記式(1)で表される化合物において、Rはエチル基、Lはカルボキシル基、nは3が好ましい。

本発明者は、上記化合物(1)が、ニテンピラムのハプテンとして好適に用いることが可能であることを案出したもので、高感度、かつ選択性の高い抗体を作製することが可能であり、当該抗体を用いた高感度かつ定量性に優れたニテンピラムの免疫学的測定手段および免疫学的測定方法を提供することができる。

【0013】

本発明は、上記化合物をハプテンとする抗体であって、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り得られるニテンピラムに対する抗体またはフラグメントである。

本発明においては、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、動物においてニテンピラム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抗ニテンピラム抗体を得ることができる。また、本発明にはFabフラグメントやF(ab')<sub>2</sub>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。

【0014】

本発明においては、前記抗体がモノクローナル抗体またはフラグメントであることが好ましい。

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、これら抗体の中でも、ニテンピラムに対しては、モノクローナル抗体が高感度であり、しかも選択性が高いことを見出した。

【0015】

本発明は、上記の抗体またはそのフラグメントを産生するハイブリドーマである。

【0016】

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。

【0017】

10

20

30

40

50

具体的には、本発明においては、前記ハイブリドーマがNPR-1H12-15であることが好ましい。

こうしたハイブリドーマによって、ニテンピラム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、ニテンピラムの免疫学的測定に好適に用いることができる。

【0018】

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ニテンピラムの測定手段である。

【0019】

本発明の測定手段は、本発明のモノクローナル抗体を含むことにより、ニテンピラムの免疫学的測定方法に好適に用いられ、ニテンピラムを特異的、高感度および簡便に測定することができる手段を提供することができる。

10

【0020】

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ニテンピラムの測定キットである。

【0021】

上記測定手段のうち、測定キットとした場合には、特に現場でのニテンピラムの免疫学的測定作業などに好適に用いられ、ニテンピラムを特異的、高感度および簡便に測定することができる手段を提供することができる。

【0022】

本発明は、上記いずれかの抗体および測定手段を用いることを特徴とする測定方法である。

20

【0023】

本発明のモノクローナル抗体および測定手段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測定方法が可能である。

【発明の効果】

【0024】

本発明の化合物は、ニテンピラムハプテンとして好適に用いられるものである。当該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、動物においてニテンピラム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ニテンピラム抗体を得ることができる。前記式(1)で表される化合物において、Rはエチル基、Lはカルボキシル基、nは3の場合、ニテンピラムハプテンとして特に優れた効果を奏する。

30

【0025】

本発明の抗体がモノクローナル抗体である場合、ニテンピラムに対して高感度であり、しかも他の類似化合物に対する交差反応性が認められず、ニテンピラム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る、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。本発明の測定手段は、本発明のモノクローナル抗体を含むことにより、ニテンピラムの免疫学的測定方法に好適に用いられ、ニテンピラムを特異的、高感度および簡便に測定することができる手段を提供することができる。さらに、測定キットとした場合には、特に現場でのニテンピラムの免疫学的測定作業などに好適に用いることができる。本発明のニテンピラムの測定方法は、本発明のモノクローナル抗体または測定手段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。

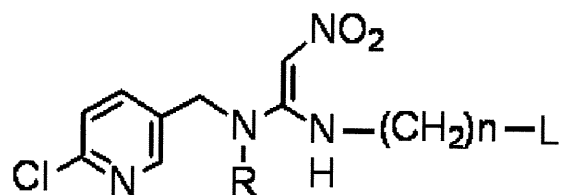
40

【発明を実施するための最良の形態】

【0026】

本発明は、下記式(1)：

## 【化1】



(式中、Rは炭素数1～5のアルキル基、Lはカルボキシル基、アミノ基、アルデヒド基およびヒドロキシル基を、nは1～10の整数を表す)で表わされる構造を有する化合物を提供する。該化合物は、ニテンピラムのハブテン化合物として好適に使用される。

10

## 【0027】

上記化合物(1)において、 $-(CH_2)_n-L$ はニテンピラム構造の一部に導入したスペーサーアームを表し、nは1～10の整数である。ニテンピラムと結合対象の高分子化合物との間に適度なスペースを有するためには、nは3～5が好ましく、3がより好ましい。

## 【0028】

上記化合物(1)において、Lが対象高分子と共有結合することにより、複合体を形成する。

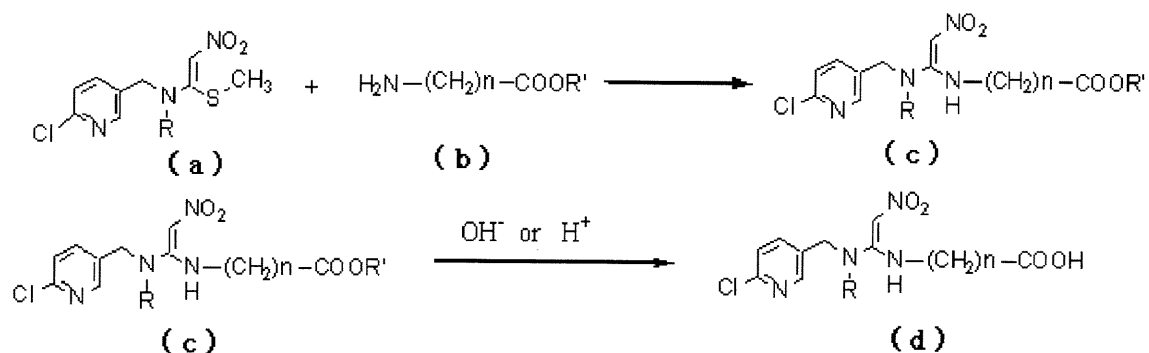
## 【0029】

ハブ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Lがカルボキシル基のものは、下記反応式：

20

## 【0030】

## 【化3】



30

(式中、Rおよびnは前記と同じ意味を、R'は枝分かれしてもよいアルキル基を表す)で示す方法で、各工程において高収率で化合物を得ることから好適に用いられる。

## 【0031】

具体的には、前記反応式において、

## (1) 工程1

出発原料として1-[N-(6-クロロ-3-ピリジルメチル)-N-アルキル]アミノ-1-メチルチオ-2-ニトロエテン(a)を用い、-アミノアルキルカルボン酸エステル(b)を適当な溶媒中で反応させ、4-[1-[N-(6-クロロ-3-ピリジルメチル)-N-アルキル]アミノ-2-ニトロビニル]アミノアルキルカルボン酸アルキルエステル(c)を得る。

40

## 【0032】

この反応で溶媒としては特に限定されないが、例えばメタノール、エタノールなどのアルコール類、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、ジプロピルエーテル、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およびそれらの混合溶媒を挙げることができる

50

。また、この反応で用いられる試薬の量としては、化合物 ( a ) 1 モルに対し化合物 ( b ) は 1 ~ 1 . 5 倍モルで充分であるが、反応を促進し副反応を抑える目的で塩基存在下に行うこともできる。反応温度は通常室温から溶媒の沸点の温度で、30分から10時間程度行う。

【0033】

(2) 工程2

化合物 ( c ) を、アルカリまたは酸で加水分解することにより目的とする 4 - [ 1 - [ N - ( 6 - クロロ - 3 - ピリジルメチル ) - N - アルキル ] アミノ - 2 - ニトロビニル ] アミノアルキルカルボン酸 ( 化合物 ( d ) ) を得る。

【0034】

エステルの加水分解は、アルカリ加水分解、酸加水分解等の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。例えばアルカリ加水分解の場合、前記カルボン酸エステルを、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またはこれら有機溶媒と水との混合溶媒に溶解し、次いで水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸カリウム等のアルカリ水溶液を加えて、0 ~ 50 程度で、30分~3時間程度反応させることにより行うことができる。また、L が t e r t - ブチル基の場合にはジクロロメタン、アセトニトリル、ベンゼン、トルエンなどの適当な溶媒中、塩酸、硫酸、リン酸などの鉱酸、あるいはトリフルオロ酢酸などの有機酸存在下、0 から 60 で、30分から20時間反応させることにより行うことができる。

10

20

【0035】

上記各工程における詳細な合成方法は、実施例に記載する。

【0036】

このようにして得られたニテンピラムのハプテン化合物は、牛血清アルブミン ( B S A ) 、ウサギ血清アルブミン ( R S A ) 、オボアルブミン ( O V A ) 、スカシ貝ヘモシアニン ( K L H ) 、チログロブリン ( T G ) 、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。

【0037】

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、ニテンピラムのハプテン化合物のカルボキシ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。

30

【0038】

本発明は、上記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得られるニテンピラムに対する抗体を提供する。当該抗体は、ニテンピラムに対する特異性を有する抗体である。

【0039】

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抱合される。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。

40

【0040】

前記モノクローナル抗体は、ニテンピラムに対する特異性と他の物質に対する交差反応性とを明確にするため、下記のような I C 5 0 値を有することが好ましい。ここで I C 5 0 値とは、間接競合 E L I S A または直接競合 E L I S A 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。

【0041】

50

すなわち、本抗体は、ニテンピラムを測定対象とする場合は、直接競合E L I S Aによるニテンピラムに対するI C 5 0が5 0 0 n g / m L以下であることが好ましく、5 0 n g / m L以下がより好ましい。

【0042】

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、常法に従ってニテンピラムの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)。

【0043】

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を行うことができる。

【0044】

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。

【0045】

前記のように調製した抗原を2 m g / m L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、B a L b / 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D M E M培地 (ダルベッコ改変イーグル培地) 中で、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 (P 3 X 6 3 A g 8 . 6 5 3) と細胞数の比5 : 1 ~ 1 0 : 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5 0 % ポリエチレングリコール (分子量1 5 0 0) 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 $5 \times 10^5$  個 / m LになるようにH A T培地を加えて懸濁し、細胞懸濁液を9 6穴プラスチックプレートに2 5 0  $\mu$  L / ウェルの量で分注して、3 7 °C、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H A T培地で置換して、1 0日から1 4日間培養する。培養液中の抗体の活性をE L I S A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、抗ニテンピラム抗体を産生している安定なハイブリドーマ株を得る。

【0046】

本発明では、前記方法によりハイブリドーマを作製しN T P - 1 H 1 2 - 1 5について、寄託番号F E R M - P - 2 0 3 8 5の下、2 0 0 5年2月1日に独立行政法人製品評価技術基盤機構、特許生物寄託センターに寄託した。

【0047】

本発明のハイブリドーマは、培地 (例えば、1 0 % 牛胎児血清を含むD M E M) 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。

【0048】

また、本発明においては、ニテンピラムに特異的に結合する抗体を含むことにより、ニ

10

20

30

40

50

テンピラムを簡便に測定することができ、測定手段としての測定キットおよび後述するニテンピラムの測定方法に好適に使用することができる。前記キットは、さらに、測定法に応じて、標識された二次抗体もしくは標識されたニテンピラムのハプテン（抗原）、緩衝液、検出試薬および/またはニテンピラムの標準溶液等を含む。好ましいキットは、E L I S A法に用いられるものであり、下記直接競合E L I S A法に用いる場合、固相化されたニテンピラムに対する抗体、固相化抗体を保持する担体、酵素標識された抗原および検出試薬などを含む。

**【0049】**

さらに、本発明は、前記抗体または測定手段を用いることを特徴とするニテンピラムの測定方法に関する。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（R I A）、酵素免疫測定法（E L I S A）、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E L I S Aが好ましい。E L I S A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、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ等が挙げられる。

10

**【0050】**

E L I S Aによる測定法は、間接競合E L I S Aまたは直接競合E L I S A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E L I S Aによって行うことができる。

20

**【0051】**

（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  $\mu$ g/mLから100  $\mu$ 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。

**【0052】**

（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、B S A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時間一晩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。

30

**【0053】**

（3）各種濃度のニテンピラムを含む試料に、ニテンピラムの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。

**【0054】**

酵素結合ハプテンの調製は、ニテンピラムの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。

40

**【0055】**

（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

ニテンピラム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分間で約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。

**【0056】**

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ニテンピラムの量を決定する。

**【0057】**

（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

50

によって検量線からニテンピラム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、450nm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、492nmの吸光度を測定する。なお、バックグラウンド値を補正するため、630nmの吸光度も同時に測定することが望ましい。

【0058】

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、415nmでの吸光度を測定する方法があげられる。

10

【0059】

ニテンピラムを添加しない反応溶液の吸光度に対して、ニテンピラム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。既知の濃度のニテンピラム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、試料中のニテンピラムの濃度を算出することができる。

【0060】

別の態様としてニテンピラムの測定は以下のような手順により間接競合ELISAによって行うことができる。

20

【0061】

(1) 固相化抗原を担体に固相化する

用いる担体は、通常のELISA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0.01μg/mLから100μg/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。

【0062】

(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。

30

【0063】

(3) 前記(1)および(2)で処理された固相表面に各種濃度のニテンピラム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ニテンピラムに競合的に反応させて、固相化抗原-抗体複合体およびニテンピラムに対する抗体複合体を生成させる。

40

【0064】

反応は、通常室温、1~2時間程度で行うことができる。

ニテンピラムは、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、ニテンピラムを溶解させ、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などがあげられ、含有量は、5~50重量%程度である。

【0065】

(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ニテンピラムの量を決定することができる。

【0066】

50

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。例えばニテンピラム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、担体に結合したニテンピラム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。

【0067】

（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 E L I S A 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ニテンピラムの量を算出することができる。

10

【0068】

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 E L I S A の工程（3）または間接競合 E L I S A に供することができる。例えば測定対象物が土壌または食品の場合、ニテンピラム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 5 g に、メタノール 5 mL 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 2 mL を 2500 R p m 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。

【0069】

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。

20

【実施例】

【0070】

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。

【0071】

< 実施例 1 >

（a）4 - [ 1 - [ N - ( 6 - クロロ - 3 - ピリジルメチル ) - N - エチル ] - 2 - ニトロビニル ] アミノ酪酸 t e r t - ブチルエステルの合成

30

0 . 5 g ( 1 . 7 4 m m o l ) の 1 - [ N - ( 6 - クロロ - 3 - ピリジルメチル ) - N - エチルアミノ - 1 - メチルチオ - 2 - ニトロエテン ( a ) をエタノール 10 mL に溶解し、攪拌しながら、4 - アミノ酪酸 t e r t - ブチルエステルのエタノール 2 mL 溶液をゆっくり加えた。室温で 3 時間攪拌後、反応液を濃縮し、残渣をシリカゲルカラム ( n - ヘキサン - 酢酸エチル = 1 : 1 ) で精製し、黄色油状物として 4 - [ 1 - [ 6 - ( 6 - クロロ - 3 - ピリジルメチル ) - N - エチル ] アミノ - 2 - ニトロビニル ] アミノ酪酸 t e r t - ブチルエステルを得た ( 0 . 4 g 、 収率 5 8 % ) 。

【0072】

（b）4 - [ 1 - [ N - ( 6 - クロロ - 3 - ピリジルメチル ) - N - エチル ] アミノ - 2 - ニトロビニル ] アミノ酪酸の合成

40

0 . 3 g ( 0 . 7 5 m m o l ) の 4 - [ 1 - [ N - ( 6 - クロロ - 3 - ピリジルメチル ) - N - エチル ] アミノ - 2 - ニトロビニル ] アミノ酪酸 t e r t - ブチルエステルをジクロロメタン 8 mL に溶解し、攪拌しながらトリフルオロ酢酸 0 . 8 mL を加えた。室温で 16 時間攪拌後、反応液を濃縮し、残渣をシリカゲルカラム ( 酢酸エチル - メタノール = 8 : 1 ) で精製し黄色油状物として 4 - [ 1 - [ N - ( 6 - クロロ - 3 - ピリジルメチル ) - N - エチル ] アミノ - 2 - ニトロビニル ] アミノ酪酸を得た ( 0 . 2 g 、 収率 7 5 % ) 。

【0073】

<sup>1</sup> H M N R ( D M S O - d <sub>6</sub> )

50

1.11 (3H、t、CH<sub>3</sub>)、1.73 (2H、m、CH<sub>2</sub>)、2.23 (2H、t、CH<sub>2</sub>)、3.24 (2H、q、CH<sub>2</sub>)、3.37 (2H、t、CH<sub>2</sub>)、4.51 (2H、s、CH<sub>2</sub>)、6.43 (1H、s、CH)、7.51 (1H、d、CH)、7.53 (1H、d、CH)、8.34 (1H、s、CH)、8.65 (1H、br、NH)

【0074】

<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 (KLH) と本発明ニテンピラム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。

【0075】

実施例1で製造した4-[1-[N-(6-クロロ-3-ピリジルメチル)-N-エチル]アミノ-2-ニトロビニル]アミノ酪酸(ニテンピラムハプテン)1.7mg、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200μLに溶解し、この溶液を25℃の暗所に1.5時間放置しニテンピラムハプテン溶液とした。

10

【0076】

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

【0077】

このKLH溶液に、先に調製したニテンピラム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(PBS、10mMリン酸緩衝液、150mM NaCl、pH7.0)に対して透析した後、-40℃で貯蔵した。このようにして得られたニテンピラムハプテンとKLHとの結合体を免疫原として使用した。

20

【0078】

<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(BSA)とニテンピラム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。

【0079】

ニテンピラムハプテン1.7mg、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200μLに溶解し、この溶液を25℃の暗所に1.5時間放置しニテンピラムハプテン溶液とした。

30

【0080】

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

【0081】

このBSA溶液に、先に調製したニテンピラム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。このようにして得られたニテンピラムハプテンとBSAとの結合体を固相化抗原として使用した。

40

【0082】

<実施例4> (モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製)

実施例2で調製した免疫原を2mg/mLとなるようにPBS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6~7週齢のメスのBALB/cマウスに腹腔投与した。

【0083】

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;

50

F I C A ) を等量混合した 0 . 5 m g / m L の免疫原 1 0 0  $\mu$  L 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、血清中の抗体力価を間接競合法で確認した。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 1 0  $\mu$  g / 1 0 0  $\mu$  L  $\cdot$  P B S 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。

**【 0 0 8 4 】**

摘出した脾臓を無血清 D M E M 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、1 5 0 0 R p m で遠心し、上清を吸引除去して、新しい無血清 D M E M 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。

10

**【 0 0 8 5 】**

あらかじめ培養してあったミエローマ細胞 ( P 3 X 6 3 A g 8 . 6 5 3 ) を回収し、遠沈、上清除去、無血清 D M E M 培地で再浮遊を 2 回繰り返した。

**【 0 0 8 6 】**

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 1 0 : 1 ~ 7 . 5 : 1 になるように混合し、1 5 0 0 R p m で 5 分間遠心して、上清を吸引除去した。

**【 0 0 8 7 】**

遠沈管を激しく攪拌しながら 5 0 % ポリエチレングリコール ( 分子量 1 5 0 0 ) 溶液 2 m L を約 6 0 秒かけて添加した。次いで約 1 0 m L の無血清 D M E M を攪拌しながら 3 ~ 4 分かけて添加した。

20

**【 0 0 8 8 】**

遠沈管を 1 0 0 0 r p m , 5 分で遠心して上清を完全に吸引除去し、脾細胞が 2 . 5  $\times$  1 0 <sup>6</sup> 個 / m L になるように H T 培地 ( ヒポキサンチン、チミジン、1 0 % 牛胎児血清入り D M E M 培地 ) に浮遊させ、9 6 穴培養プレートに 1 0 0  $\mu$  L / ウェル分注し、3 7 、8 % 炭酸ガス、加湿条件下で培養を開始した。

**【 0 0 8 9 】**

翌日に約 4 0  $\mu$  L / ウェルの H A T 培地 ( ヒポキサンチン、チミジン、アミノプテリン、1 0 % 牛胎児血清入り D M E M 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 H T 培地を

30

**【 0 0 9 0 】**

培養開始から 1 0 日後に培養液を採取し、間接競合阻害法でニテンピラムに対する抗体を産生しているウェルを選別し、9 6 ウェル、4 8 ウェル、2 4 ウェルと順次培養スケールを上げた。

**【 0 0 9 1 】**

2 4 ウェルの段階で限界希釈法によるクローニングを行ない、ニテンピラムに対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株 [ N P R - 1 H 1 2 - 1 5 ] を得た。

**【 0 0 9 2 】**

< 実施例 5 > ( モノクローナル抗体の作製 )

40

実施例 4 で得られたハイブリドーマ株を 1 0 % 牛胎児血清入り D M E M で培養し、約 2  $\times$  1 0 <sup>6</sup> 個の細胞を B A L B / c メス R e t i r e 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 I g G 精製を行った。

**【 0 0 9 3 】**

< 実施例 6 > ( ニテンピラムハプテンと西洋ワサビペルオキシダーゼとの結合体の調製 )

直接競合 E L I S A 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ニテンピラムハプテンと西洋ワサビペルオキシダーゼとの結合体を調製した。

**【 0 0 9 4 】**

ニテンピラムハプテン 1 . 7 5 m g を 6 0  $\mu$  L の D M S O で溶解し、その溶液に 3 0 .

50

0 mg/mLになるようにDMSOに溶解したN-ヒドロキシスクシンイミド溶液40 μLと19.0 mg/mLになるようにDMSOに溶解した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溶液100 μLを加えた。その混合液を室温において1.5時間、暗所に静置、反応させた。反応後、西洋ワサビペルオキシダーゼ10 mgをpH 8.0のホウ酸緩衝液1 mLに溶解した溶液を混和しながら少量ずつ加えた。混合した溶液を室温において1.5時間暗所に静置、反応させた。反応終了後、4で一晩生理的リン酸緩衝液(PBS、10 mMリン酸緩衝液、150 mM NaCl、pH 7.0)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。

【0095】

10

<実施例7>(直接競合ELISA法によるモノクローナル抗体NPR-1H12-15の測定)

(1)抗マウスIgGヤギ抗体をPBS緩衝液(10 mM NaPB, 150 mM NaCl)で10 μg/mLに希釈し、96穴マイクロプレートに100 μg/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、10 mM NaPB、150 mM NaCl、pH 7.0)を300 μg/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。

【0096】

20

(2)実施例5で得られたモノクローナル抗体NPR-1H12-15をPBS緩衝液(0.2% BSA、10 mMリン酸緩衝液、150 mM NaCl、pH 7.0)で2.0 μg/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 μg/ウェルずつ分注した、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。

【0097】

(3)HRP(西洋ワサビペルオキシダーゼ)とニテンピラムハプテンの結合体をPBS緩衝液(0.4% BSA、10 mMリン酸緩衝液、150 mM NaCl、pH 7.0)で0.25 μg/mLに希釈しHRP希釈液とした。

【0098】

30

(4)上記HRP希釈液と10%メタノール溶液に溶解したニテンピラム標準溶液(1.0、10.0、100および1000 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NPR-1H12-15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。

【0099】

(5)HRP基質溶液(100 μg/mLの3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジンおよび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。

【0100】

40

モノクローナル抗体NPR-1H12-15溶液についての直接競合阻害法によるニテンピラムの標準阻害曲線を図1に示す。モノクローナル抗体NPR-1H12-15溶液を用いた直接競合ELISA法によるニテンピラムの測定可能な範囲は10 ng/mL~100 ng/mLであり、50%阻害を示す値(IC50値)は27 ng/mLであった。

【0101】

以上の結果から、本発明のニテンピラムハプテン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、ニテンピラム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、簡便且つ低コストで測定できることがわかる。

50

## 【0102】

実施例8（抗体のニテンピラム構造類似化合物に対する交差反応性）

ニテンピラムと化学構造が類似している農薬について抗体NPR-1H12-15の交差反応性を調べた。交差反応性は、実施例7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。

## 【0103】

交差反応率(%) = (ニテンピラムのIC50値 / 試験化合物のIC50値) × 100  
その結果、殺虫剤のアセタミプリド、イミダクロプリド、チアクロプリド、チアメトキサム、クロチアニジン、ジノテフラン、硫酸ニコチンおよび殺菌剤のピリフェノックスに対していずれも交差反応性は0.1%以下であり、抗体NPR-1H12-15はニテンピラムに特異的な抗体であった。

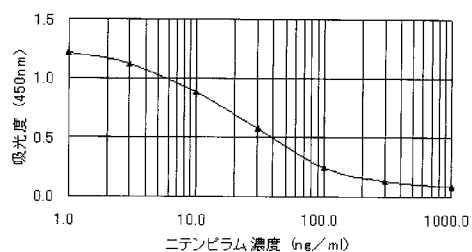
10

## 【図面の簡単な説明】

## 【0104】

【図1】抗体NPR-1H12-15を用いた直接競合ELISA法におけるニテンピラムに対する標準曲線を示す。

## 【図1】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
<b>A 0 1 N 47/42 (2006.01)</b>			A 0 1 N 47/42			Z
G 0 1 N 33/15 (2006.01)			G 0 1 N 33/15			C

(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 高井 幹夫  
 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 美岐子  
 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) 4B065 AA91X AB05 AC14 BA08 CA25 CA46  
 4C055 AA01 BA02 BA39 CA02 CA27 CB01 CB02 CB10 DA01  
 4H011 AC01 BB11  
 4H045 AA11 DA76 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2006282547A5</a>	公开(公告)日	2007-11-29
申请号	JP2005102687	申请日	2005-03-31
[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 高井幹夫 内ヶ島美岐子 伊東茂壽		
发明人	山下 弘 高井 幹夫 内ヶ島 美岐子 伊東 茂壽		
IPC分类号	C07D213/61 G01N33/53 G01N33/577 C07K16/44 C12N5/10 A01N47/42 G01N33/15		
FI分类号	C07D213/61.CSP G01N33/53.S G01N33/577.B C07K16/44 C12N5/00.B A01N47/42.Z G01N33/15.C		
F-TERM分类号	4B065/AA91X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4C055/AA01 4C055/BA02 4C055/BA39 4C055/CA02 4C055/CA27 4C055/CB01 4C055/CB02 4C055/CB10 4C055/DA01 4H011/AC01 4H011/BB11 4H045/AA11 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
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	JP2006282547A		

#### 摘要(译)

要解决的问题：获得用于制备高灵敏度和高选择性的烯啶虫胺抗体的半抗原化合物和针对烯啶虫胺的抗体，并提供使用该抗体且具有高灵敏度和优异性的烯啶虫胺的免疫测定方法定量，测定试剂盒和免疫测定方法。ŽSOLUTION：烯啶虫胺的半抗原化合物具有由式(1)表示的结构(R是1-5C烷基；L是羧基，氨基，醛基或羟基；n是1的整数-10)。Ž