

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テームコード [*] (参考)
C 0 7 K 16/44		C 0 7 K 16/44	4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 5
15/01		G 0 1 N 33/53	J 4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/08			T 4 H 0 4 9
G 0 1 N 33/53		33/531	A
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 14数) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2000－15781(P2000－15781)	(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
(22)出願日	平成12年1月25日(2000.1.25)	(72)発明者	伊東 茂壽 東京都港区浜松町1丁目27番14号 株式会社 環境免疫技術研究所内
		(72)発明者	金子 隆司 東京都港区浜松町1丁目27番14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】 トリフェニルスズ化合物の抗体及び測定方法

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、トリフェニルスズ化合物の抗体及び測定方法を提供することを目的とする。

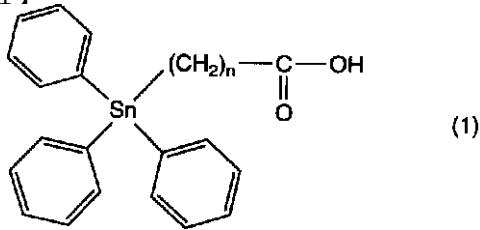
【解決手段】 本発明の抗体は、トリフェニルスズ又はその部分にスパーサーアーム及び結合のための官能基を共有結合させた構造を有するトリフェニルスズ誘導体をハプテンとして使用することにより得られる。

1

【特許請求の範囲】

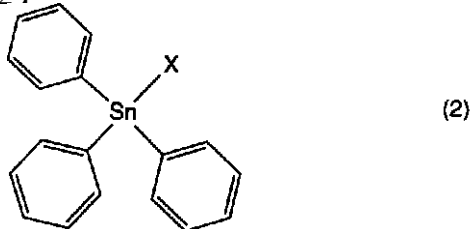
【請求項1】以下の式(1)：

【化1】



〔式(1)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(2)：

【化2】



〔式(2)中、Xは、F、Cl、BrおよびIからなるグループから選択されるハロゲン原子であるか、あるいは、H、OH、CH₃COO、ClCH₂COO、(CH₃)₂N-CS-S、(C₆H₅)₃-Sn-O及びCH₂=CH-CH₂からなるグループから選択される基である〕で表される構造を有す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(2)で表される構造を有する化合物 30 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2】請求項1に記載の方法により製造された、式(2)で表される構造を有する化合物に反応性を示す抗体又はそのフラグメント。

【請求項3】モノクローナル抗体である、請求項2に記載の抗体又はフラグメント。

【請求項4】寄託番号FERM P-17697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Sn2I1-9-1である、請求項2若しくは 3 に記載の抗体又はフラグメント。

【請求項5】請求項2ないし4のいずれか1項に記載の抗体又はフラグメントを産生するハイブリドーマ。

【請求項6】寄託番号FERM P-17697で寄託されている、請求項5に記載のハイブリドーマ。

【請求項7】請求項2ないし4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、式(2)で表される構造を有する化合物の免疫化学的測定方法。

【請求項8】さらに、請求項1において式(1)で表される構造を有する化合物、および／又は、請求項1にお 50

2

いて式(1)で表される化合物と高分子化合物若しくは標識物質との結合体を用いることを含む、請求項7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】トリフェニルスズ化合物等の有機スズ化合物のハプテン化合物、抗原、抗体及びそのフラグメントに関する。

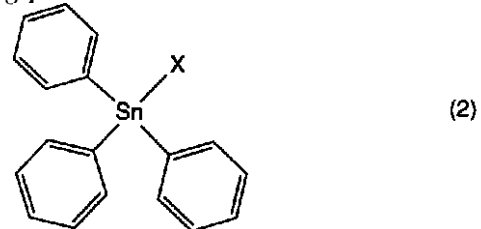
【0002】本発明はさらに、前記抗原、抗体及びそのフラグメントを用いた免疫化学的測定方法に関する。

【0003】

【従来の技術】トリフェニルスズ化合物は、以下の式(2)：

【0004】

【化3】



【0005】〔式(2)中、Xは、F、Cl、BrおよびIからなるグループから選択されるハロゲン原子であるか、あるいは、H、OH、CH₃COO、ClCH₂COO、(CH₃)₂N-CS-S、(C₆H₅)₃-Sn-O及びCH₂=CH-CH₂からなるグループから選択される基である〕で表される構造を有する、有機スズ化合物に含まれる、一群の化合物である。トリフェニルスズ化合物は、式(2)中のXによって、酢酸トリフェニルスズ、塩化トリフェニルスズ、クロロ酢酸トリフェニルスズ、N、N-ジメチルジチオカルバミン酸トリフェニルスズ、フッ化トリフェニルスズ、水酸化トリフェニルスズ、酸化ビス(トリフェニルスズ)、水素化トリフェニルスズ、アリルトリフェニルスズ等が知られている。(以下、これらのトリフェニルスズ化合物を総称して「トリフェニルスズ」ということがある。)

トリフェニルスズ化合物を含む有機スズ化合物は、「外因性内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)」の1種として、着目されている。「外因性内分泌攪乱化学物質」は、いわゆる「環境ホルモン」とも呼称され、「動物の生体内に取り込まれた場合に、本来、その生体内で営まれている正常なホルモン作用に影響を与える外因性の物質」を意味する。近年、内分泌学を始めとする医学、野生動物に関する科学、環境科学等の研究者・専門家によって、環境中に存在するいくつかの化学物質が、動物の体内のホルモン作用を攪乱することを通じて、生殖機能を阻害したり、悪性腫瘍を引き起こすなどの悪影響を及ぼしている可能性があるとの指摘がなされている。これが「外因性内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)問題」

と呼ばれているものであり、環境保全上の新たな重要な課題の一つとなっている。外因性内分泌攪乱化学物質問題に関しては、人や野生動物への影響を示唆する科学的報告が数多くなされているものの、報告された異常と原因物質との因果関係、そうした異常が発生するメカニズム等に関してはいまだ十分には明らかにされていない状況にある（「外因性内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について－環境ホルモン戦略計画SPEED'98」、1998年5月、環境庁）。

【0006】トリフェニルスズ化合物を含む有機スズ化合物は、船底や漁網への生物の付着を防止する船底防汚塗料や漁網防汚剤などとして、1960年半ばより多用されてきた。しかしながら、近年、これらの有機スズ化合物の野生動物への影響を指摘する報告が多数なされている。具体的には、最も多く報告され懸念されているのは、海産巻貝のインボセックスの原因物質として、トリブチルスズ(TBT)、トリフェニルスズ(TPT)などの有機スズ化合物があげられていることである。インボセックスとは雌に雄の生殖器官(ペニスおよび輸卵管)が形成されて発達する現象のことで、雄性生殖器が産卵口をふさぐため、生殖能力低下あるいは生殖不能を招く。現在では世界各地で報告がされており、その原因は有機スズ化合物によることがわかっており、外因性内分泌攪乱化学物質によるという因果関係が証明された数少ないケースの一つである。作用メカニズムはよくわかっていないが、抗アンドロゲン物質によってインボセックスが低減することから、ホルモン様作用であると考えられている。レセプターアッセイは陰性のため、有機スズ化合物がステロイドホルモン代謝酵素のアロマターゼを阻害することにより、性ホルモンのバランスを乱すものと推測されている。有機スズ化合物は難分解性であり、蓄積性もあり、インボセックスの他にも、長期的な毒性として成長阻害、リンパ球の減少、個体数の減少等にも関与していると指摘されている。

【0007】有機スズ化合物は、水生生物に対する急性毒性が非常に強く($LC_{50}=0.1-10\mu g/l$)、残留性や慢性毒性もあるため、1990年代に入って規制の対象となった。日本では、トリブチルスズ化合物のうちビス・トリブチルスズ・オキシド(TBTO)が1990年1月に化学物質の審査および製造等の規制に関する法律(化審法)の第一種特定化学物質に指定され、トリフェニルスズ化合物の7物質およびトリブチルスズ化合物の13物質も、同法の第二種特定化学物質に指定された(「環境ホルモン・環境汚染懸念化学物質」第45頁-第46頁、第60頁-第61頁、1999年3月1日(株)シー・エム・シー発行)。

【0008】化学物質による環境汚染の未然防止と汚染の早期発見及び適切な化学物質環境安全対策を目的として、環境庁では、毎年化学物質環境安全性総点検調査が行われている。その結果、トリフェニルスズ化合物およ

びトリブチルスズ化合物は環境中に広範囲に残留しており、その汚染レベルは水質、底質そして生物(魚介類)ともに横這いまたは改善といった状況になっている(環境庁ホームページ、<http://www.eic.or.jp>、平成11年11月29日)。環境や食品に関する安全確保のためには、これらの環境に含有される、トリフェニルスズ化合物等の有機スズ化合物の量を迅速かつ正確に測定調査し、監視する必要がある。

【0009】従来、トリフェニルスズ等の有機スズ化合物は、例えば水質試料、魚介類等の生物試料から精製した後、ガスクロマトグラフィー(GC)やガスクロマトグラフィー質量分析(GC/MS)により分析されてきた。そして、法規制及び使用実績の関係から典型的にはトリフェニルスズは塩化トリフェニルスズ換算値、トリブチルスズはTBTO換算値によって分析値が表示されている。但し、有機スズ化合物は、そのままの形ではGCに適用できないため、Grignard試薬によるアルキル化、テトラエチルホウ酸ナトリウム($NaBEt_4$)によるエチル化、四水素化ホウ酸ナトリウム($NaBH_4$)による水素化などにより、アルキル化ないし水素化してから分析する必要がある。即ち、例えば、試料をヘキサンで抽出し、Grignard試薬によって誘導体化した後に、フロリジルカラムクロマトグラフィーで精製後、GCで測定する方法等が採用されている

(「環境ホルモンのモニタリング技術－分析・測定法の実例－」第109頁-第114頁、1999、11、15(株)シー・エム・シー発行)。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。トリフェニルスズ等の有機スズ化合物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。

【0010】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。

【0011】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。

【0012】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、トリフェニルスズ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。

【0013】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スペーサーアーム（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。

【0014】トリフェニルスズについては、その必要性が非常に高かったにもかかわらず、適切な抗体はもとより、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。

【0015】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、トリフェニルスズ化合物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_{ab}断片等を意味する。

【0016】本発明はその一態様において、トリフェニルスズに反応性を有するモノクローナル抗体を提供する。本発明は、また、トリフェニルスズ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（トリフェニルスズハプテン）を提供することを目的とする。

【0017】本発明は、さらに、トリフェニルスズ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。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。

【0018】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／又は前記トリフェニルスズ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含む、トリフェニルスズの免疫化学的測定方法を提供することを目的とする。

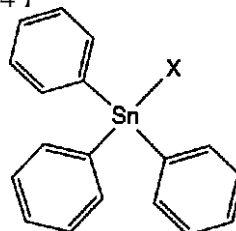
【0019】

【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、トリフェニルスズ又はその部分にスペーサーアーム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、トリフェニルスズ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。

【0020】本発明の対象となるトリフェニルスズ化合物は、以下の式（2）：

【0021】

【化4】



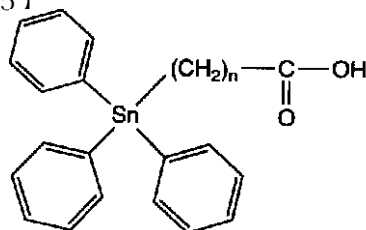
(2)

【0022】〔式（2）中、Xは、F、Cl、BrおよびIからなるグループから選択されるハロゲン原子であるか、あるいは、H、OH、CH₃COO、ClCH₂COO、(CH₃)₂-N-CS-S、(C₆H₅)₃-Sn-O及びCH₂=CH-CH₂からなるグループから選択される基である〕で表される構造を有する一群の化合物である。

【0023】本発明の抗体は、例えば、トリフェニルスズ化合物の一部分にスペーサーアーム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）：

【0024】

【化5】



(1)

【0025】〔式（1）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。式（1）中、好ましくは、nは2である。

【0026】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、トリフェニルスズ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トリフェニルスズの免疫化学的測定方法に関する。

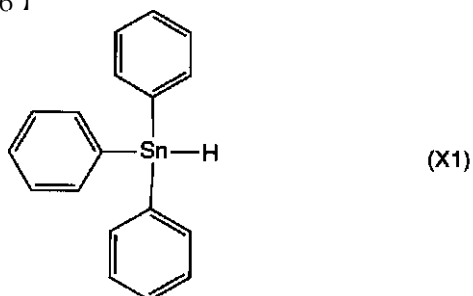
【0027】トリフェニルスズハプテンの作製

式(1)で表されるトリフェニルスズハプテンは、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。

【0028】まず、例えば、式(1)においてnが2の化合物の場合、以下の式(X1)：

【0029】

【化6】



【0030】で表される構造を有するトリフェニルスズヒドライドに、以下の式(X2)

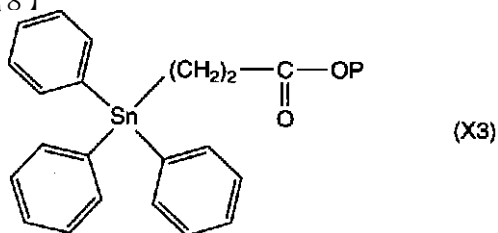
【0031】

【化7】 $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{COOP}$ (X2)

【0032】〔式(X2)中、Pはカルボキシル基の保護基である〕で表される構造を有するオレフィン化合物を反応させて、以下の式(X3)：

【0033】

【化8】



【0034】〔式(X3)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。反応は、0℃から200℃、好ましくは室温から100℃で、5 40 分から10時間、好ましくは1から4時間行う。

【0035】式(X3)の化合物の合成のための反応は、2, 2'-アゾビス(イソブチロニトリル)、過酸化ベンゾイル、過酸化ジ-tert-ブチル等のラジカル反応開始剤の存在下で行うのが好ましく、また例えば、四塩化炭素、クロロホルム、テトラヒドロフラン、ベンゼン、トルエン等の不活性溶媒中で行うこともできる。

【0036】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 50

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。

【0037】さらに、式(X3)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。

【0038】すなわち、酸加水分解の場合は、式(X3)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 20 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。

【0039】また、アルカリ加水分解の場合は、式(X3)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等の水溶液を加えて、0℃から溶媒の沸点の温度、好ましくは0℃から80℃で、5 30 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。

【0040】更に、Pがベンジル基の場合、反応加水分解は水素による加水素分解によっても行うことができる。更にまた、Pがシリル原子を含む基の場合、反応加水分解はテトラ-*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。

【0041】nが2以外の場合も公知の方法を用いて式(1)の化合物を合成できる。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。

【0042】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、例えば統生化学実験講座、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。

【0043】トリフェニルスズハプテンと高分子化合物との結合体の作製

上述のように合成されたトリフェニルスズ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。

【0044】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。

【0045】トリフェニルスズハプテンと高分子化合物との結合は、例えば、混合酸無水物法（B. F. Erlanger et al. : J. Biol. Chem. 234 1090-1094 (1954)）、又は活性化エステル法（A. E. KARU et al. : J. Agric. Food Chem. 42 301-309 (1994)）等の公知の方法によって行うことができる。

【0046】混合酸無水物法において用いられる酸無水物は、通常のショッテンー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ー高分子化合物結合体が製造される。ショッテンー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、ショッテンー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ン、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蟻酸エステルとしては、例えばクロロ蟻酸メチル、ブromo蟻酸メチル、クロロ蟻酸エチル、ブromo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蟻酸エステルと高分子化合物の使用割合は、広い範囲から適宜選択され得る。

【0047】一方、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。

【0048】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）、ジオキサン等が使用できる。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。

【0049】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、トリフェニルスズ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。

【0050】また、上記と同様の方法により、酵素等の標識物質をトリフェニルスズ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、³²P、¹²⁵I等の放射性物質、化学発光物質などがある。

【0051】ポリクローナル抗体の作製

トリフェニルスズ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、トリフェニルスズハプテンと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。

【0052】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。

【0053】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、トリフェニルスズ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。本発明においてトリフェニルスズ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法においてとも約0.01 μ g/mlの濃度でトリフェニルスズと反応できる（実施例5、図1）。

【0054】モノクローナル抗体の作製

トリフェニルスズ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。

【0055】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トリフェニルスズ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。

【0056】以下、本発明のトリフェニルスズ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。

(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。

【0057】(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細胞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。

【0058】(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/NS1-1-Ag 4-1 (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等の骨髓腫株細胞、あるいはラット由来の210. RCY3. Ag 1. 2. 3. (Y3) (Nature, 277, 131-133, (1979)) 等を使用できる。

【0059】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 1×10^6 以上の細胞数を確保する。

【0060】(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。

【0061】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。

【0062】(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、トリフェニルスズに対する抗体活性を測定する。

【0063】さらに、測定によりトリフェニルスズ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」；軟寒地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「ソータークローン法」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。

【0064】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、抗トリフェニルスズ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。

【0065】（g）の工程で抗体を調製するための大量培養は、フ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。

【0066】これらにより得られた培養上清液あるいは腹水液を抗トリフェニルスズ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トリフェニルスズ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合わせることにより実施できる。

【0067】以上のようにして得られた抗トリフェニルスズ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。

【0068】抗体によるトリフェニルスズの測定
本発明で使用する抗体によるトリフェニルスズの測定法としては、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ブラニング発行、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。

【0069】トリフェニルスズの測定は、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。

（a）まず、固相化用抗原であるトリフェニルスズ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。

【0070】（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。

（c）これに各種濃度のトリフェニルスズ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トリフェニルスズに競合的に反応させて、固相化抗原-抗体複合体及び、トリフェニルスズ-抗体複合体を生成させる。

【0071】（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トリフェニルスズの量を決定することができる。

（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。

【0072】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。

【0073】なお、担体に固相化させる抗原としては、抗体を作製したトリフェニルスズ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）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）において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。さらに、式（1）に含まれない他のトリフェニルスズ化合物を固相化抗原として使用することも可能である。

【0074】（b）工程のブロッキングは、抗原（トリフェニルスズ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、トリフェニルスズ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、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できる。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60mM NaCl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。

【0075】次いで(c)工程において、トリフェニルスズ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トリフェニルスズと反応させることにより、固相化抗原-抗体複合体及びトリフェニルスズ-抗体複合体が生成する。

【0076】この際、抗体としては、第一抗体として本願発明のトリフェニルスズ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。

【0077】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。

【0078】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。

【0079】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トリフェニルスズの量を算出することができる。

【0080】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。

【0081】トリフェニルスズ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。既知の濃度のトリフェニルスズ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、試料中のトリフェニルスズの濃度を算出できる。

【0082】あるいはトリフェニルスズの測定は、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。

(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。

【0083】(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。

(c) 上記工程とは別に、各種濃度のトリフェニルスズを含む試料に、トリフェニルスズ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。

【0084】(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合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トリフェニルスズの量を決定する。

【0085】(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。

【0086】(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トリフェニルスズ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。

【0087】(c) 工程において用いる酵素結合ハプテンの調製は、トリフェニルスズ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、トリフェニルスズを含む試料と混合する。

【0088】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トリフェニルスズハプテン自体のみならず、式(1)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)においてn

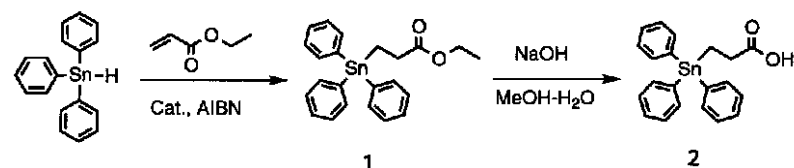
が抗体作製用と相違する化合物を、標識用抗原として使用することもできる。さらに、式(1)に含まれない他のトリフェニルスズ化合物も、標識用抗原として使用可能である。

【0089】(d)工程においてトリフェニルスズを含む試料及び酵素結合ハプテンを抗体固相担体に接触させ、トリフェニルスズ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。トリフェニルスズ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。

【0090】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トリフェニルスズの量を算出することができる。

【0091】本発明のモノクローナル抗体Sn2I1-9-1は、直接競合ELISA法において約0.1ng/mlから約100ng/ml、好ましくは約1ng/mlから約10ng/mlの濃度範囲でトリフェニルスズと反応する(実施例7、図2)。

【0092】さらに、前述したように直接競合ELISA法において抗体作製用と異なるハプテンを標識用抗原*



【0097】3-トリフェニルスズプロピオン酸エチル(1)の合成

トリフェニルスズヒドリド1.75g(5mmol)、アクリル酸エチル0.75g(7.5mmol)および2,2'-アゾビス(イソブチロニトリル)3mgの混合物を60℃で3時間攪拌した。反応混合物を濃縮後、残渣をシリカゲルカラム(n-ヘキサン:酢酸エチル=8:1)で精製し、1.2g(収率53%)の(1)を得た。

【0098】3-トリフェニルスズプロピオン酸(2)の合成

メタノール20ml中の3-トリフェニルスズプロピオン酸エチル(1)1.0g(2.2mmol)の溶液に、水20ml中の水酸化ナトリウム0.44g(11mmol)の溶液を加え、2時間環流攪拌した。減圧下

*として使用でき、その組み合わせによって直接競合ELISA法において固有の反応性を示す。

【0093】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。

【0094】例えば、本発明のモノクローナル抗体Sn2I1-9-1は、塩化トリフェニルスズ、フッ化トリフェニルスズ、水酸化トリフェニルスズ、酢酸トリフェニルスズおよび酸化ビストリフェニルスズの各トリフェニルスズ化合物と約0.01nmol/mlないし約1nmol/mlの範囲で反応する(実施例8、図3)。一方、スズ元素を他の元素に置換した類縁化合物については、塩化トリフェニル鉛と若干の反応性を示すものの、他のトリフェニル化合物にはほとんど反応性を示さず、本発明の抗体はトリフェニルスズ化合物に対して高い特異性を有する(実施例8、図4)。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。

【0095】

【実施例】実施例1 トリフェニルスズハプテンの合成

【0096】

【化9】

にメタノールを留去し、残渣に20mlの水と30mlの酢酸エチルを加え分液した。水層を1Nの塩酸で酸性にし、酢酸エチルで抽出した(30ml×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。残渣の結晶をリグロインで再結晶化し0.69g(収率74%)の(2)を得た。

【0099】融点:>250℃

上記トリフェニルスズハプテン(2)の¹H NMRによる物性データ(ケミカルシフトδ)を以下に示す。

【0100】

【表1】

¹H NMR (DMSO-D₆, 400MHz) δ
1.58(2H, t, CH₂), 2.65(2H, t, CH₂), 7.45(15H, m, Ar-H), 12.25(1H, s, COOH)

実施例2 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トリフェニルスズハプテンとBSAとの結合体を混合酸無水物法を用いて作製した。

【0101】実施例1で作製したトリフェニルスズハプテン2.1mg (5 μ mol)をDMF 5mlに溶解し、N-メチルモルホリン25 μ lを添加し、室温で20分間攪拌した。次に、クロロ蟻酸イソブチル10 μ lを添加し、室温で20分間攪拌した(これを、以下「A液」という)。

【0102】一方、BSA 67mg (1 μ mol)を蒸留水2mlに溶解し、0.5M水酸化ナトリウム水溶液を加えてpHを9に調整した後、攪拌しながらDMF 1.3mlを滴下した。この溶液にpHが9になるように0.5M水酸化ナトリウム水溶液を適宜添加しながらA液を滴下し、40℃にて一晩反応させた。反応後、蒸留水にて4℃で透析したものを凍結乾燥し、トリフェニルスズハプテンとBSAとの結合体(以下、「トリフェニルスズハプテン/BSA結合体」と言う)を調製した。以下、免疫用抗原として用いた。

【0103】また、同様の方法を用いて、トリフェニルスズハプテンとRSAとの結合体(以下、「トリフェニルスズハプテン/RSA結合体」と言う)も作製した。

実施例3 トリフェニルスズハプテンと標識物質との結合体の作製

トリフェニルスズハプテンとHRPとの結合体を活性化エステル法により作製した。

【0104】トリフェニルスズハプテン0.03mmolを無水DMF 30mlに溶解し、濃度1 μ mol/mlのトリフェニルスズハプテンDMF溶液を調製した。一方、N-ヒドロキシコハク酸イミド0.1mmolとジクロヘキシルカルボジイミド0.1mmolをそれぞれ各1mlのDMFに溶解し、濃度100 μ mol/mlのDMF溶液を調製した。

【0105】トリフェニルスズハプテンの1 μ mol/ml DMF溶液5mlにN-ヒドロキシコハク酸イミドの100 μ mol/ml DMF溶液50 μ lとジクロヘキシルカルボジイミドの100 μ mol/ml DMF溶液50 μ lを添加し、室温にて一晩攪拌して反応させた。反応後、10,000rpmで15分間遠心し、上清と沈殿とに分離した。

【0106】次に、PBS 4mlにHRP 20.1mg (0.5 μ mol)を溶解した後、無水DMF 0.5mlを添加した溶液を調製しておき、その溶液に前記の上清2.55ml (2.5 μ mol)を加え、室温にて一晩攪拌した後、40℃にて1時間反応させた。反応後、トリフェニルスズハプテンとHRPとの結合体を145mM NaCl-10mMリン酸緩衝液(pH7.2:以下「PBS」と言う)中にメタノールを30%含有させた液で3回透析し、さらにPBSによる透析を5

回行って精製した。以下、「HRP結合トリフェニルスズハプテン」と言う。

【0107】実施例4 免疫感作

免疫にはBalb/cマウスを用いた。実施例2で作製したトリフェニルスズハプテン/BSA結合体(免疫用抗原)100 μ g又は200 μ gをPBS 100 μ lに溶解し、等量のプロイント完全アジュバンドと混合して、Balb/cマウスの皮下に接種した。その4週間後に免疫用抗原100 μ gとプロイント不完全アジュバンドを前記と同様に混合し、マウスの皮下に追加免疫した。さらにその2週間後に同様にして免疫用抗原100 μ gとプロイント不完全アジュバンドの混合物をマウスの皮下に追加免疫した。また、その2週間後にPBS 200 μ lに溶解した免疫用抗原30 μ gをマウスの尾静脈又は腹腔に追加免疫した。

【0108】実施例5 抗血清の塩化トリフェニルスズに対する反応性

実施例4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法にて塩化トリフェニルスズを測定し、抗血清を評価した。

【0109】免疫用抗原と同様に調製したトリフェニルスズハプテン/RSA結合体溶液(0.1 μ g/ml)を50 μ l/ウェルの量で96ウェルマイクロプレートにコーティングし(5ng/50 μ l/ウェル)、4倍希釈したブロックエース(「Block Ace」、雪印乳業社製、コードNo. UK-25B)でブロッキングしてアッセイ用プレートを作製した。これに抗血清4000倍希釈液と、各種濃度の塩化トリフェニルスズと2 μ g/mlのBSAを溶解した60%メタノール-PBS溶液とを等量混合し、その50 μ lを各ウェルに入れ、室温で2時間反応させた。

【0110】PBSで5回洗浄した後に、10倍希釈のブロックエースを用いて2000倍に希釈したペルオキシダーゼ結合抗マウスIgGヤギ抗体(Tagco社製)を50 μ l/ウェルの量で加え、室温にて1時間反応させた。PBSで5回洗浄した後に、2mg/mlのOPD及び0.02%の過酸化水素を含む0.1Mクエン酸-リン酸緩衝液(pH5.0)を50 μ l/ウェルの量で加え、室温にて10分間反応させて発色させた。

【0111】次に、1N硫酸を50 μ l/ウェルの量で加えて反応を停止し、490nmの吸光度を測定した。結果の一例を図1に示す。図1より、マウスの抗血清(ポリクローナル抗体)を使用することにより、塩化トリフェニルスズの量を0.01 μ g/mlないし100 μ g/mlの範囲で測定することができた。

【0112】実施例6 ハイブリドーマの作製

実施例4に続いて、血清中の抗トリフェニルスズ抗体活性が高くなったマウスの脾細胞と、ミエローマ細胞(Sp2/O-Ag14)とを山下修二らの方法(組織細胞

化学：日本組織細胞化学会編：学際企画，1986年）に従ってポリエチレングリコール法により融合し、培養した。実施例5と同様の方法でコーティング及びブロッキングしたプレートに60%メタノール-PBS溶液を50μl/ウェルの量で加え、次いで、細胞の増殖が認められた培養上清液をそれぞれ50μl/ウェルの量で加え、室温にて2時間反応させた。

【0113】PBSで5回洗浄した後、10倍希釈のブロックエースを用いて2000倍に希釈したペルオキシダーゼ結合抗マウスIgGヤギ抗体（Tago社製）を50μl/ウェルの量で加え、室温にて1時間反応させた。PBSで5回洗浄した後、2mg/mlのOPD及び0.02%の過酸化水素を含む0.1Mクエン酸-リン酸緩衝液（pH5.0）を50μl/ウェルの量で加え、室温にて10分間発色させた。

【0114】次に、1N硫酸を50μl/ウェルの量で加えて、反応を停止し、490nmの吸光度を測定し、反応性を示す細胞（ハイブリドーマ）を選抜した。次に、各ウェルの塩化トリフェニルスズとの反応性を実施例5に記載した間接競合ELISA法で調べ、目的の抗体を産生している細胞について限界希釈法によりクロニングを行った。その結果、数株のハイブリドーマが抗トリフェニルスズ抗体を産生する細胞としてクローン化された。そのうちのSn2I1-9-1を平成12年1月18日に、寄託番号FERM P-17697で、工業技術院生命工学工業技術研究所（〒305-0046茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託した。

【0115】実施例7 直接競合ELISA法による塩化トリフェニルスズの測定

実施例6で得られたハイブリドーマSn2I1-9-1をマウスの腹腔に移植し、10日後ないし15日後に得られた腹水を採取し、硫酸分画法によりモノクローナル抗体を分取した。（以降、モノクローナル抗体は、これらを産生するハイブリドーマと同一の名称を用いる。）このSn2I1-9-1抗体を用いて直接競合ELISA*

$$\text{阻害率 (\%)} = 100 - \frac{100 \times (\text{各濃度の吸光度} - \text{バックグラウンドの吸光度})}{(0 \text{ nmol/ml の吸光度} - \text{バックグラウンドの吸光度})}$$

【0122】図3より、本発明のモノクローナル抗体Sn2I1-9-1は、トリフェニルスズ基を有する一群の化合物をいずれも0.01nmol/mlないし1nmol/mlの範囲で測定できた。

【0123】また、図4に示すように、塩化トリフェニルスズのスズ元素を他元素に置換した類縁化合物に対し、本抗体は塩化トリフェニル鉛とは反応するが、塩化トリフェニルメタン、塩化トリフェニルケイ素、塩化トリフェニルゲルマニウムとは反応しないことが分かった。

【図面の簡単な説明】

*A法にて塩化トリフェニルスズの量を測定した。

【0116】上記のSn2I1-9-1抗体溶液（10μg/ml）を50μl/ウェルの量で96ウェルマイクロプレートに入れ、4℃で一晩静置してコーティングし、さらに4倍希釈のブロックエース（雪印乳業社製）でブロッキングを行い、アッセイ用のプレートを作製した。各種濃度の塩化トリフェニルスズを含む20%メタノール-PBS溶液と、実施例3で作製したHRP結合トリフェニルスズハプテンのPBS溶液との等量混合液を50μlずつ各ウェルに入れ、25℃で1.5時間反応させた。

【0117】反応後、PBSで5回洗浄した後、2mg/mlのOPD及び0.02%の過酸化水素を含む0.1Mクエン酸-リン酸緩衝液（pH5.0）を50μlずつ各ウェルに入れ、室温で10分間静置して発色反応を行った。

【0118】次に、1N硫酸を50μlずつ各ウェルに加えて発色反応を停止させ、490nmの吸光度を測定した。この結果を図2に示した。図2より、直接競合ELISA法において、本発明のモノクローナル抗体Sn2I1-9-1は、塩化トリフェニルスズを0.1ng/mlないし100ng/mlの範囲で測定することができた。

【0119】実施例8 モノクローナル抗体の交差反応性の評価

実施例6で得られたハイブリドーマSn2I1-9-1に由来するモノクローナル抗体Sn2I1-9-1について、その培養上清を用いてBSAを添加しないこと以外は実施例5に記載した間接競合ELISA法と同様にして、5種類のトリフェニルスズ化合物及び5種類のトリフェニルスズ類縁化合物に対する反応性を検討した。

【0120】この結果を図3及び図4に示す。ここで、阻害率は次式で定義される。

【0121】

【化10】

【図1】図1は、間接競合ELISA法を用いた、抗血清による塩化トリフェニルスズとの反応性を示す。

【図2】図2は、本発明のモノクローナル抗体Sn2I1-9-1を用いた直接競合ELISA法による塩化トリフェニルスズとの反応性を示す。

【図3】図3は、培養上清を用いた間接競合ELISA法による、モノクローナル抗体Sn2I1-9-1の評価を示す。

【図4】図4は、培養上清を用いた間接競合ELISA法による、モノクローナル抗体Sn2I1-9-1の評価を示す。

【図1】

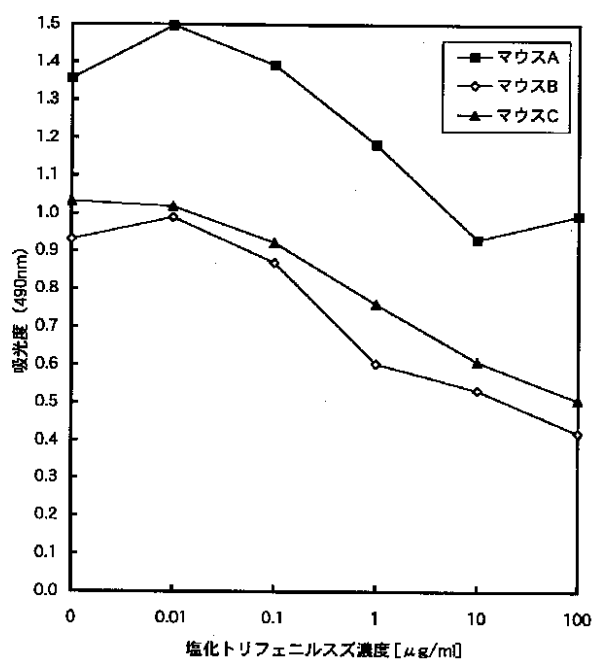


図1 抗血清による塩化トリフェニルスズの測定

【図2】

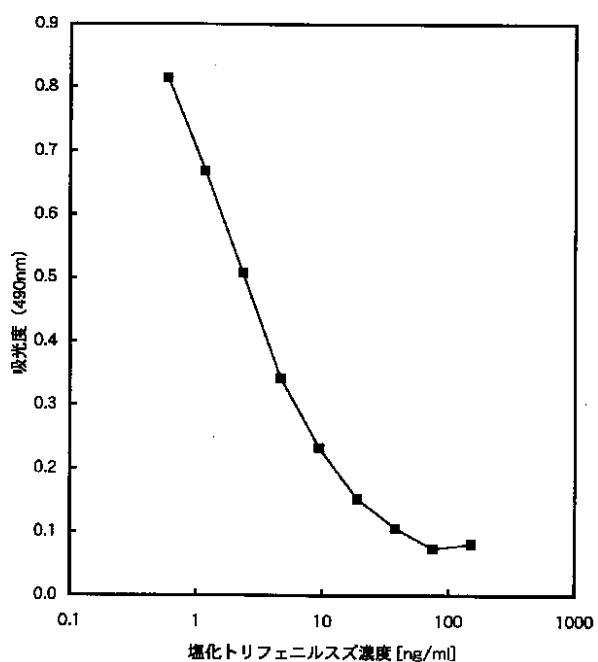


図2 直接競合ELISA法による塩化トリフェニルスズの測定

【図3】

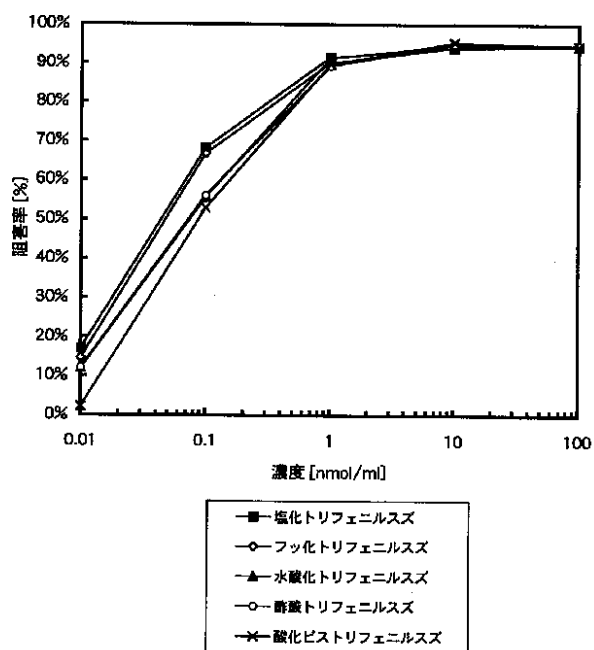


図3 培養上清を用いた間接競合ELISA法によるモノクローナル抗体Sn2I1-9-1の評価 (その1)

【図4】

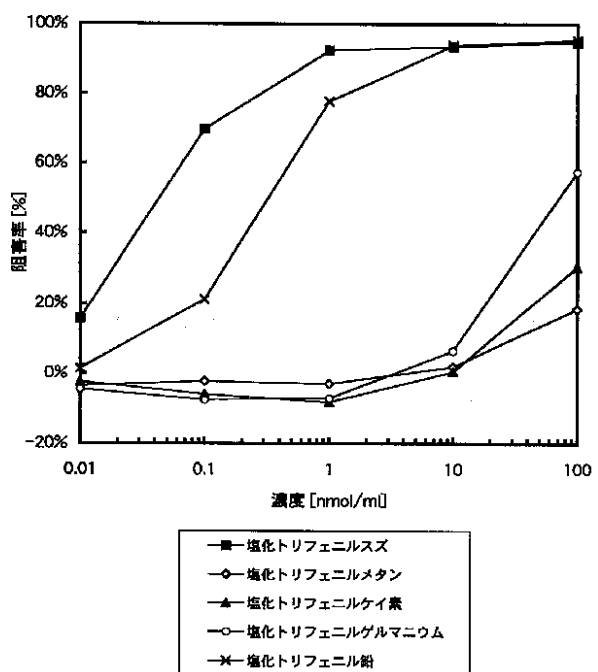


図4 培養上清を用いた間接競合ELISA法によるモノクローナル抗体Sn2I1-9-1の評価 (その2)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード ⁸ (参考)	
G O 1 N	33/53	G O 1 N	33/577	B
	33/531	C O 7 F	7/22	L
	33/577	C 1 2 N	5/00	B
// C O 7 F	7/22		15/00	E
(72)発明者	宗像 浩	(72)発明者	鎌田 良雄	
	東京都港区浜松町 1 丁目27番14号 株式会		東京都港区浜松町 1 丁目27番14号 株式会	
	社環境免疫技術研究所内		社環境免疫技術研究所内	
(72)発明者	面田 内記	F ターム(参考)	4B064 AG27 CA20 CC24 DA13 DA16	
	東京都港区浜松町 1 丁目27番14号 株式会		4B065 AA92X AB05 AC14 BA08	
	社環境免疫技術研究所内		BD39 CA25	
(72)発明者	渡邊 繁幸		4H045 AA11 BA52 CA42 DA70 DA76	
	東京都港区浜松町 1 丁目27番14号 株式会		EA50	
	社環境免疫技術研究所内		4H049 VN03 VP01 VQ25 VR24 VU31	

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2001206900A5	公开(公告)日	2007-03-22
申请号	JP2000015781	申请日	2000-01-25
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 金子隆司 宗像浩 面田内記 渡邊繁幸 鎌田良雄		
发明人	伊東 茂壽 金子 隆司 宗像 浩 面田 内記 渡邊 繁幸 鎌田 良雄		
IPC分类号	C07K16/44 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/577 C12N5/10 C12N15/01 C07F7/22		
FI分类号	C07K16/44 C12P21/08 G01N33/53.J G01N33/53.T G01N33/531.A G01N33/577.B C12N5/00.B C12N15/00.X C07F7/22.L		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B064/DA16 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/BD39 4B065/CA25 4H045/AA11 4H045/BA52 4H045/CA42 4H045/DA70 4H045/DA76 4H045/EA50 4H049/VN03 4H049/VP01 4H049/VQ25 4H049/VR24 4H049/VU31		
其他公开文献	JP2001206900A		

摘要(译)

本发明的目的是提供三苯基锡化合物的抗体和测定方法。通过使用具有结构的三苯基锡衍生物作为半抗原，所述三苯基锡衍生物具有其中间隔臂和用于键合的官能团共价键合至三苯基锡或其一部分的结构。