

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テームコード [*] (参考)
C 0 7 C275/54		C 0 7 C275/54	4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/44		C 0 7 K 16/44	4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 5
15/02		G 0 1 N 33/53	J 4 H 0 0 6
C 1 2 P 21/08			F 4 H 0 4 5
審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 13数) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2000－73605(P2000－73605)	(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3月16日(2000.3.16)	(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】 フルフェノクスロンのハプテン化合物、抗体及び測定方法

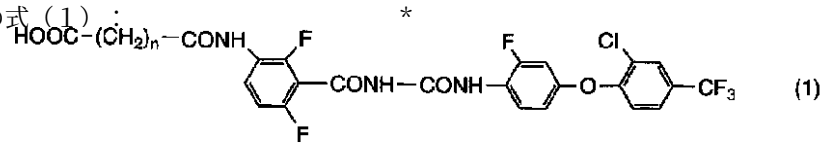
(57)【要約】

【課題】 本発明は、フルフェノクスロンのハプテン化合物、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】 本発明のハプテン化合物は、フルフェノクスロン又はその部分にスペ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。

【特許請求の範囲】

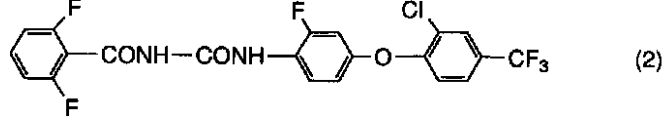
【請求項1】以下の式(1)：



〔式(1)中、nは1-5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、nが2である請求項1に記載の化合物。

【請求項3】請求項1又は2に記載された化合物と高分*



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5】請求項3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(2)で表される化合物に20 反応性を示す抗体又はそのフラグメント。

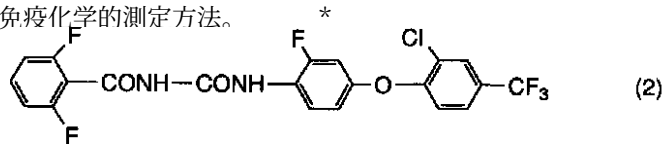
【請求項6】モノクローナル抗体である、請求項5に記載の抗体又はフラグメント。

【請求項7】寄託番号FERM P-17733で寄託されているハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体48A27-1-1である、請求項5若しくは6に記載の抗体又はフラグメント。

【請求項8】請求項5ないし7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9】寄託番号FERM P-17733で寄託30 されている請求項8に記載のハイブリドーマ。

【請求項10】請求項5ないし7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)で表される化合物の免疫化学的測定方法。



【0005】で表される構造を有する、昆虫成長制御剤である。昆虫成長制御剤は、昆虫のキチン合成阻害ある40 いは幼若ホルモン様物質(JHA)などで、脱皮・変態を攪乱することにより害虫を死亡させる制虫的な作用のある殺虫剤である。昆虫の表皮はキチンが主成分であり、その合成阻害により制虫作用を表す化合物がキチン合成阻害剤である。キチンが温血動物にはないので人畜毒性の懸念はほとんどない。種選択性が高く、天敵に対する影響は少ない。幼虫期に効果が高く、処理後次の脱皮時に脱皮できずに死亡する。成虫期には効果のないものもあるが、次世代の虫数を減少させる効果があるものもある。遅効的であり、使用時期が大切となるが、適期50

*【化1】

*子化合物又は標識物質との結合体。

【請求項4】請求項1又は2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(2)：

【化2】

*【請求項11】さらに、請求項1若しくは2に記載の化合物又は請求項3に記載の結合体を用いることを含む、請求項10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、1-[4-(2-クロロ- α , α -トリフルオロ-p-トリルオキシ)-2-フルオロフェニル]-3-(2,6-ジフルオロベンゾイル)尿素(以下、本明細書中「フルフェノクスロン」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】フルフェノクスロンは、以下の式(2)：

【0004】

【化3】

に使用すれば残効が長く、防除回数の削減に役立つ。

【0006】フルフェノクスロンは、ベンゾフェニル尿素系の昆虫成長制御剤であり、主として経口的に幼虫体内に取り込まれ、キチン質の生合成を阻害する。その結果、幼虫の脱皮は不完全となり死に至る。幼虫の蛹化時や羽化時にも活性を一部示す。本剤はりん翅目害虫、ハダニ類、ヒメヨコバイ、アザミウマ類に活性を示す。ハダニ類やアザミウマ類では、本剤を取り込んだ成虫の産下卵は孵化が抑制される。また、本剤の殺虫効果は遅効的であるが、残効性がある(農業ハンドブック第133頁、第139頁-第140頁及び第629頁 1998年版 (社)日本植物防疫協会)。

【0007】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。フルフェノクスロンについては、農薬登録保留基準が、果実で2ppm、野菜で0.5ppm、てんさいで0.5ppm、茶で15ppm等と定められている（最新 農薬の規制・基準値便覧、1995年、第311頁、（社）日本植物防疫協会）。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、フルフェノクスロンの量を迅速かつ正確に測定することが必要である。

【0008】従来、フルフェノクスロンは例えば果実、野菜、てんさい、荒茶等から抽出し、精製した後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により分析されてきた。即ち、例えば、試料をアセトンで抽出し、凝固法を行った後、ヘキサンに転溶し、ヘキサン-アセトニトリル分配し、さらに、ヘキサン-アセトニトリルを溶媒として用いたフロリジルカラムクロマトグラフィーで精製後、HPLCで測定する方法等が採用されている（「最新 農薬の残留分析法」 第314頁-第316頁、中央法規出版 1995年4月1日発行）。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の費用を必要とする等の問題点がある。フルフェノクスロ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。

【0009】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。

【0010】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。

【0011】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、フルフェノクスロ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。

【0012】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パーサーアーム（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。

【0013】フルフェノクスロンについては、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。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、フルフェノクスロ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、例えばF_{ab}断片等を意味する。

【0015】本発明はその一態様において、フルフェノクスロン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、フルフェノクスロ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（フルフェノクスロンハプテン）を提供することを目的とする。

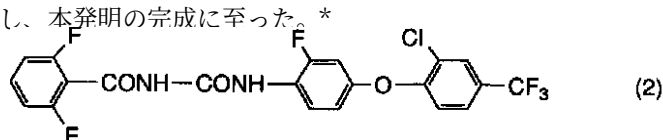
【0016】本発明は、さらに、フルフェノクスロンハプテンと高分子化合物との結合体を提供することを目的とする。本発明は、さらにまた、前記抗体又はそのフラグメントを産生するハイブリドーマを提供することを目的とする。

【0017】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／又は前記フルフェノクスロ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含む、フルフェノクスロンの免疫化学的測定方法を提供することを目的とする。

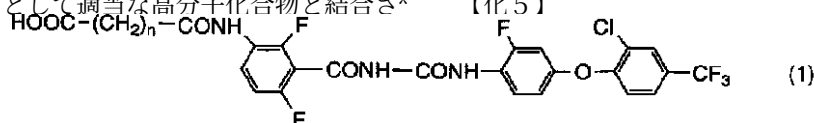
【0018】

【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、フルフェノクスロン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、フルフェノクスロ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。^{*}



【0021】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、フルフェノクスロン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^{*}

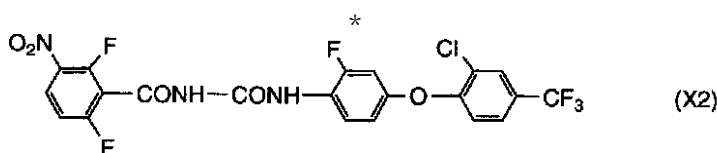


【0023】「式(1)中、nは、1-5の整数である」で表される構造を有する化合物を、抗体作製のためのハプテンとして使用する。式(1)中、nは好ましくは2である。

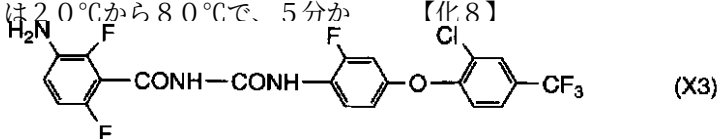
【0024】本発明は、前記ハプテン化合物、ハプテン化合物と高分子化合物との結合体、フルフェノクスロンに反応する抗体及びその作製方法、並びに該ハプテン化合物又は該抗体を用いるフルフェノクスロンの免疫化学的測定方法に関する。

【0025】フルフェノクスロンハプテンの作製

式(1)で表されるフルフェノクスロンハプテンは、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。



【0030】で表される構造を有する1-[4-(2-クロロ-4-トリフルオロメチルフェノキシ)-2-フルオロフェニル]-3-(2,6-ジフルオロ-3-ニトロベンゾイル)尿素を得る。有機溶媒としては、例えば、ジクロルメタン、クロロホルム、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、ベンゼン、トルエン、ジエチルエーテル等を挙げることができる。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



【0032】で表される構造を有する1-(3-アミノ-2,6-ジフルオロベンゾイル)-3-[4-(2-クロロ-4-トリフルオロメチルフェノキシ)-2-フル

^{*}【0019】本発明の対象となるフルフェノクスロンは、以下の式(2)：

【0020】

【化4】

^{*}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)：

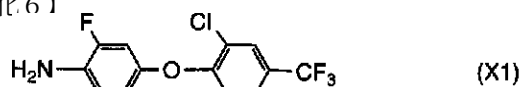
【0022】

【化5】

^{*}【0026】まず、特開平2-252記載の方法で合成できる2,6-ジフルオロ-3-ニトロベンゾイルイソシアネートに、有機溶媒中、以下の式(X1)：

【0027】

【化6】



【0028】で表される構造を有する4-(2-クロロ-4-トリフルオロメチルフェノキシ)-2-フルオロアニリンを反応させて、以下の式(X2)：

【0029】

【化7】

ら20時間、好ましくは30分から5時間行う。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、ロジウム炭素またはラネーニッケル等の触媒の存在下、接触水素還元で、式(X2)の化合物中のニトロ基を還元し、以下の式(X3)：

【0031】

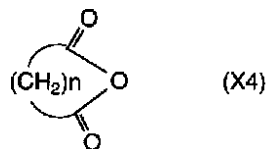
【化8】

ルオロフェニル]尿素を得る。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2時間行う。

【0033】最後に、式(X3)の化合物を、有機塩基例えばピリジンの存在下、有機溶媒中または有機塩基を溶媒として用い、以下の式(X4)：

【0034】

【化9】



【0035】〔式(X4)中、n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、ジクロロメタン、クロロホルム、アセトニトリル、テトラヒドロフラン、ベンゼン、トルエン、ジエチルエーテル等を挙げることができる。反応は、0℃から溶媒の沸点の温度、好ましくは50℃から100℃で、5分から30時間、好ましくは5時間から20時間行う。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

【0036】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。

【0037】フルフェノクスロン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フルフェノクスロ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。

【0038】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。

【0039】フルフェノクスロン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. Er langer 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。

【0040】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。

【0041】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。

【0042】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。

【0043】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、フルフェノクスロ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。

【0044】また、上記と同様の方法により、酵素等の標識物質をフルフェノクスロ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、³²P、¹²⁵I等の放射性物質、化学発光物質などがある。

【0045】ポリクローナル抗体の作製

フルフェノクスロ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、フルフェノクスロンハプテンと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。

【0046】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。

【0047】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、フルフェノクスロ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。本発明においてフルフェノクスロ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法において少なくとも約100μg/mlの濃度でフルフェノクスロンと反応できる（実施例4、表2）。

【0048】モノクローナル抗体の作製

フルフェノクスロ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。

【0049】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フルフェノクスロ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

10 (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。

【0050】以下、本発明のフルフェノクスロ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。

(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。

【0051】(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。

【0052】(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-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等の骨髓腫株化細胞、あるいはラット由来の210. RY3. Ag 1. 2. 3. (Y3) (Nature, 277, 131-133, (1979))等を使用できる。

50 【0053】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。

【0054】(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。

【0055】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・アニンホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損株を使用した場合、例えば上述のDMEMやIMDMにヒポキサンチン・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。

【0056】(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、フルフェノクスロンに対する抗体活性を測定する。

【0057】さらに、測定によりフルフェノクスロ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。

【0058】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、抗フルフェノクスロ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。

【0059】(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。

【0060】これらにより得られた培養上清液あるいは腹水液を抗フルフェノクスロ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フルフェノクスロ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。

【0061】以上のようにして得られた抗フルフェノクスロ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。

【0062】抗体によるフルフェノクスロンの測定
本発明で使用する抗体によるフルフェノクスロ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。

【0063】フルフェノクスロンの測定は、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。

(a) まず、固相化用抗原であるフルフェノクスロ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。

【0064】(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) これに各種濃度のフルフェノクスロ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フルフェノクスロンに競合的に反応させて、固相化抗原-抗体複合体及び、フルフェノクスロン-抗体複合体を生成させる。

【0065】(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フルフェノクスロン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。

【0066】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 $0.01\mu\text{g}/\text{ml}$ から $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度、好ましくは $0.05\mu\text{g}/\text{ml}$ から $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 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、 $300\mu\text{l}/\text{ウェル}$ 以下で $20\mu\text{l}/\text{ウェル}$ から $150\mu\text{l}/\text{ウェル}$ 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°C 程度で一晩インキュベーションが適している。

【0067】なお、担体に固相化させる抗原としては、抗体を作製したフルフェノクスロ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)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)に含まれない他のフルフェノクスロ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。

【0068】(b)工程のブロッキングは、抗原(フルフェノクスロ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、フルフェノクスロ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°C 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。

【0069】次いで(c)工程において、フルフェノクスロ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フルフェノクスロンと反応させることにより、固相化抗原-抗体複合体及びフルフェノクスロン-抗体複合体が生成する。

【0070】この際、抗体としては、第一抗体として本願発明のフルフェノクスロ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。

【0071】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°C から 40°C 、好ましくは約 25°C 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。

【0072】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。

【0073】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フルフェノクスロンの量を算出することができる。

【0074】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オ-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。

【0075】フルフェノクスロ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。既知の濃度のフルフェノクスロ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、試料中のフルフェノクスロンの濃度を算出できる。

【0076】あるいはフルフェノクスロンの測定は、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。

(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。

【0077】(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、各種濃度のフルフェノクスロ

ンを含む試料に、フルフェノクスロ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。

【0078】(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フルフェノクスロンの量を決定する。

【0079】(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。

【0080】(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フルフェノクスロ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。

【0081】(c) 工程において用いる酵素結合ハプテンの調製は、フルフェノクスロ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、フルフェノクスロンを含む試料と混合する。

【0082】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フルフェノクスロン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)に含まれない他のフルフェノクスロン類似化合物も、標識用抗原として使用可能である。

【0083】(d) 工程においてフルフェノクスロ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、フルフェノクスロ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。フルフェノクスロ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。

【0084】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フルフェノクスロンの量を算出することができる。

【0085】本発明のモノクローナル抗体48A27-1-1は、直接競合ELISA法において好ましくは、約0.1 ng/mlから約100 ng/ml、より好ましくは約1 ng/mlから約50 ng/mlの濃度範囲でフルフェノクスロンと反応する(実施例6、図1)。

【0086】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。

【0087】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。

【0088】例えば、モノクローナル抗体48A27-1-1は、フルフェノクスロンの類縁化合物にほとんど反応性を示さず、フルフェノクスロンに対して非常に高い特異性を有する(実施例7、表3)。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。

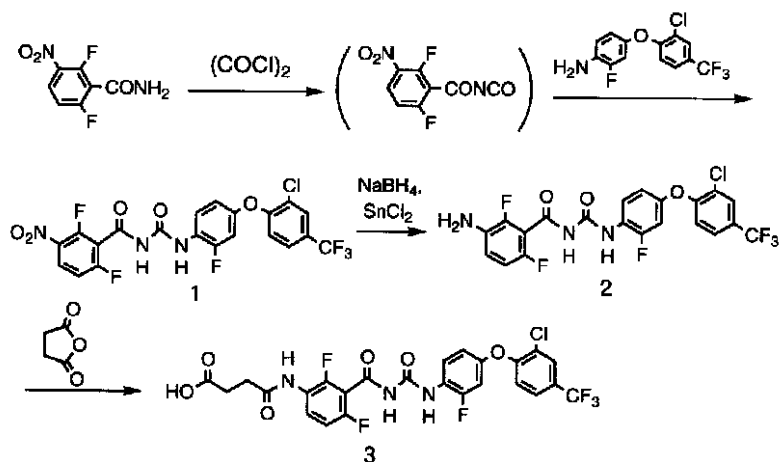
【0089】

【実施例】実施例1 フルフェノクスロンハプテンの合成

【0090】

【化10】

反応式



【0091】1-〔4-（2-クロロ-4-トリフルオロメチルフェノキシ）-2-フルオロフェニル〕-3-（2,6-ジフルオロ-3-ニトロベンゾイル）尿素（1）の合成

トルエン5ml中の2,6-ジフルオロ-3-ニトロベンズアミド1.0g（5.4mmol）と塩化オキサリル0.9g（7.1mmol）の混合物を環流下に1.5時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、残渣にトルエン5mlを加え、この溶液に4-（2-クロロ-4-トリフルオロメチルフェノキシ）-2-フルオロアニリン 1.5g（4.9mmol）を5-15℃で加え、室温で5時間攪拌した。反応混合物を濃縮後、残渣の固体を2-プロパノールから再結晶化し1.6g（収率55%）の化合物（1）を得た。

【0092】融点：163-164℃。

1-（3-アミノ-2,6-ジフルオロベンゾイル）-3-〔4-（2-クロロ-4-トリフルオロメチルフェノキシ）-2-フルオロフェニル〕尿素（2）の合成

エタノール60ml中の1-〔4-（2-クロロ-4-トリフルオロメチルフェノキシ）-2-フルオロフェニル〕-3-（2,6-ジフルオロ-3-ニトロベンゾイル）尿素（1）1.5g（2.8mmol）と塩化すず（II）二水和物3.2g（14.2mmol）の溶液に、60℃で15分間攪拌後、水素化ホウ素ナトリウム590mg（15.5mmol）を加えた。更に60℃で30分間攪拌後、この溶液に50mlの水を10-15℃で加え、15%のNaOH水溶液でpH7に中和し*

*た。エタノールを減圧下に留去し、残渣を40mlの酢酸エチルで2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。残渣の固体を2-プロパノールから再結晶化し1.1g（収率79%）の化合物（2）を得た。

【0093】融点：180-182℃。

3'-〔3-（4-（2-クロロ-4-トリフルオロメチルフェノキシ）-2-フルオロフェニル）ウレイドカルボニル〕-2',6'-ジフルオロベンゾイル）スクシニアニリド酸（3）の合成

ピリジン20ml中の1-（3-アミノ-2,6-ジフルオロベンゾイル）-3-〔4-（2-クロロ-4-トリフルオロメチルフェノキシ）-2-フルオロフェニル〕尿素（2）1.0g（2mmol）と無水コハク酸0.24g（2.4mmol）の混合物を80℃で20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（酢酸エチル：メタノール=5：1）で精製し0.61g（収率51%）の化合物（3）を得た。

【0094】上記フルフェノクスロンハプテン（3）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。

【0095】

【表1】

¹ H-NMR (DMSO-D ₆ , 400MHz) δ	
2.53 (2H, m, CH ₂),	2.65 (2H, m, CH ₂),
7.00 (1H, d, Ar:H),	7.21 (2H, m, 2Ar:H),
7.31 (1H, d, Ar:H),	7.73 (1H, m, Ar:H),
8.06 (3H, m, 3Ar:H),	9.87 (1H, d, NH),
10.38 (1H, br, NH),	11.73 (1H, br, NH),
12.15 (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フルフェノクスロンハプテンとBSAとの結合体を混合酸無水物法を用いて作製した。

【0096】実施例1で作製したフルフェノクスロンハプテン 12mgを無水ジオキサン1mlに溶解した後、N-メチルモルフォリン25μlを添加し、室温にて15分間攪拌した。次にクロロ-蟻酸イソブチル10μlを添加し、室温にて20分攪拌した。以下、これを「A液」とする。

【0097】一方、蒸留水2mlにBSAを40mg溶解し、0.5M 水酸化ナトリウムでpH7.0-7.5に調製した後、無水ジオキサンを1.3ml加え再度pH7.0-7.5に調製した。この溶液にA液をpH7.0-7.5になるよう調整しながら滴下し、10℃にて4時間反応させた。反応後、蒸留水にて4℃で透析し、さらに1%のK₂CO₃溶液で室温にて1時間処理し、再度蒸留水にて4℃で透析し、得られたフルフェノクスロンハプテンとBSAとの結合体（以下、「フルフェノクスロンハプテン/BSA」と言う）を免疫用抗原 20

とした。
【0098】また、同様の方法を用いて、フルフェノクスロンハプテンとRSAとの結合体（以下、「フルフェノクスロンハプテン/RSA」と言う）、フルフェノクスロンハプテンとHRPとの結合体（以下、「フルフェノクスロンハプテン/HRP」と言う）も作製した。

【0099】実施例3 免疫感作

免疫にはBalb/cマウスを用いた。実施例2で作製したフルフェノクスロン/BSA50μgを免疫用抗原としてPBS 100μlに溶解し、等量のフロイント 30 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週間後にフロイント不完全アジュバンドを用いて前記と同様に混合し、マウスの皮下に追*

表2. マウス抗血清の評価
(490nm吸光度)

	フルフェノクスロン濃度		吸光度の差
	0 μg/mL	100 μg/mL	
マウス-1	0.906	0.707	0.199
マウス-2	0.724	0.565	0.159
マウス-3	0.908	0.608	0.300

【0105】表2より、フルフェノクスロン100μg/mlにおいて阻害反応が認められたことから、用いた抗血清はフルフェノクスロンに対して反応性があることが確認された。

【0106】実施例5 ハイブリドーマの作製

実施例3に続いて、血清中の抗フルフェノクスロン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 50

*加免疫した。さらにその2週間後に、180μlのPBSに溶解した免疫用抗原10μgをマウス尾静脈より追加免疫した。

【0100】実施例4 抗血清のフルフェノクスロンに対する反応性

実施例3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法にてフルフェノクスロンを測定し、抗血清を評価した。

10 【0101】免疫用抗原と同様に調製したフルフェノクスロンハプテン/RSAのPBS溶液(0.5μg/ml)を50μl/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(25ng/50μl/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。このプレートに抗血清5000倍希釈液と、各種濃度のフルフェノクスロンを含む20%メタノール溶液とを等量混合し、その50μlを各ウェルに入れ、室温で1時間反応させた。

【0102】PBSで5回洗浄した後に、10倍希釈した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ヤギ抗マウスIgG抗体（Tago社製）を50μl/ウェルの量で加え、室温で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50μl/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。

【0103】次に、1N硫酸を50μl/ウェルの量で加えて反応を停止し、490nmの吸光度を測定した。結果の一例を表2に示す。

【0104】

【表2】

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4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1時間反応させた。

【0107】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（Tago社製）を50μl/ウェルの量で加え、室温で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50μl/ウェルの量で加え、室温で10分間発色反応させた。

【0108】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、各ウェルのフルフェノクスロンとの反応性を実施例4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ーニングを行った。その結果、数株のハイブリドーマが抗フルフェノクスロン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48A27-1-1を平成12年2月15日に、寄託番号FERM P-17733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。

【0109】実施例6 直接競合阻害ELISAによるフルフェノクスロンの測定

実施例5で得られたハイブリドーマ48A27-1-1をマウスの腹腔に移植し、10-15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48A27-1-1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48A27-1-1抗体を用いて直接競合ELISA法にてフルフェノクスロンの量を測定した。

【0110】上記の48A27-1-1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。各濃度のフルフェノクスロンを含む10%メタノール溶液と実施例2で作製したフルフェノクスロンハプテン/HRPを含む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。

【0111】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。

【0112】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1に示す。図1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48A27-1-1は、フルフェノクスロンを0.1ng/mlないし100ng/mlの範囲で測定することができる。

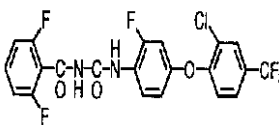
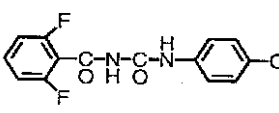
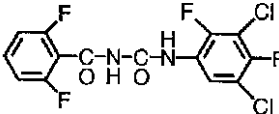
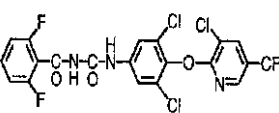
【0113】実施例7 モノクローナル抗体の評価

実施例4に記載した間接競合ELISA法を用いて、フルフェノクスロン類似化合物に対するモノクローナル抗体48A27-1-1の反応性について検討した。この結果を表3に示す。表3より、モノクローナル抗体48A27-1-1はフルフェノクスロンに対しては高い反応性を示したが、類似化合物に対しては、ほとんど反応性を示さなかった。

【0114】

【表3】

表3 抗フルフェノクスロンモノクローナル抗体の類似化合物に対する反応性

化合物	化合物名	交差反応率(%) ^a (IC ₅₀ [pmol/mL] ^b)	
		48A27-1-1	
	フルフェノクスロン	100 (2.5)	
	ジフルベンズロン	<0.01 (>100000)	
	テフルベンズロン	<0.01 (>100000)	
	クロルフルアズロン	<0.01 (>100000)	

a= (フルフェノクスロンのIC₅₀/対象化合物のIC₅₀) × 100 (%)

b=50%阻害濃度

23

【図面の簡単な説明】
【図1】図1は、本発明のモノクローナル抗体48A2*

*7-1-1を用いた直接競合ELISA法によるフルフェノクスロンとの反応性を示す。

【図1】

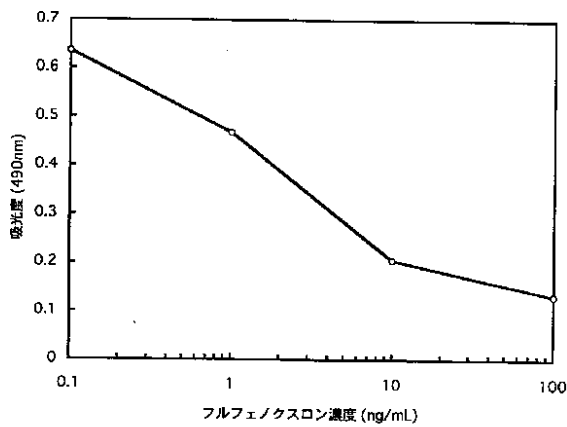


図1 48A27-1-1抗体を用いたフルフェノクスロンの測定（直接競合ELISA）

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 [*] (参考)
G 0 1 N	33/53		G 0 1 N 33/577	B
			(C 1 2 P 21/08	
		33/577	C 1 2 R 1:91)	
	/(C 1 2 P 21/08		C 1 2 N 5/00	B
	C 1 2 R 1:91)		15/00	B
(72)発明者 鎌田 良雄			F ターム(参考)	4B024 AA05 AA07 AA11 BA53 GA03
東京都港区浜松町1丁目27番14号 株式会				HA15
社環境免疫技術研究所内				4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA10
(72)発明者 面田 内記				DA11 DA13
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				CA25 CA46
(72)発明者 渡邊 繁幸				4H006 AA01 AB80 AB84 AB99 BJ50
東京都港区浜松町1丁目27番14号 株式会				BM10 BM30 BM71 BM72 BP60
社環境免疫技術研究所内				BS10 BV25 BV71
(72)発明者 宗像 浩				4H045 AA11 AA20 BA72 CA40 DA75
東京都港区浜松町1丁目27番14号 株式会				DA76 DA86 EA50 FA41 FA42
社環境免疫技術研究所内				FA72

专利名称(译)	氟虫脲的复方，抗体和测量方法		
公开(公告)号	JP2001261631A	公开(公告)日	2001-09-26
申请号	JP2000073605	申请日	2000-03-16
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 鎌田良雄 面田内記 渡邊繁幸 宗像浩		
发明人	伊東 茂壽 金子 隆司 鎌田 良雄 面田 内記 渡邊 繁幸 宗像 浩		
IPC分类号	G01N33/53 C07C275/54 C07K16/44 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/577		
FI分类号	C07C275/54 C07K16/44 C12P21/08 G01N33/53.J G01N33/53.F G01N33/577.B C12R1/91 C12N5/00. B C12N15/00.B C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA05 4B024/AA07 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA10 4B064/DA11 4B064/DA13 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H006/AA01 4H006/AB80 4H006/AB84 4H006/AB99 4H006/BJ50 4H006/BM10 4H006/BM30 4H006/BM71 4H006/BM72 4H006/BP60 4H006/BS10 4H006/BV25 4H006/BV71 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/BA72 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA41 4H045/FA42 4H045/FA72		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供氟虫脲的半抗原化合物，抗体和测量方法。 本发明的半抗原化合物具有这样的结构，其中间隔臂和用于键合的官能团与氟虫脲或其一部分共价键合。

「を用いることを特徴とする、式 (1) の

物の免疫化学的測定方法。

