

(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 - 272401

(P2001 - 272401A)

(43)公開日 平成13年10月5日(2001.10.5)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	J 4 B 0 6 4
C 0 7 C233/54		C 0 7 C233/54	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
C 1 2 P 21/08		G 0 1 N 33/577	B

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 14数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 84393(P2000 - 84393)

(22)出願日 平成12年3月24日(2000.3.24)

(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 金井 正三

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】 フタル酸エステル類のハプテン化合物、抗体及び測定方法

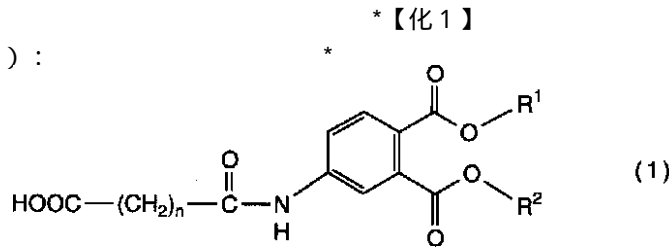
(57)【要約】

【課題】 本発明は、フタル酸エステル類のハプテン化合物、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、フタル酸エステル類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、
R¹およびR²は枝分かれしていてもよい炭素数1 - 13
のアルキル基、又はシクロヘキシル基若しくはベンジル
基であり；そしてnは1 - 10の整数である]で表され
る構造を有する化合物。

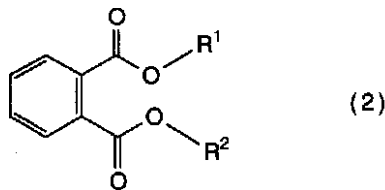
【請求項2】式(1)中、R¹及びR²がブチル基である
請求項1に記載の化合物。

【請求項3】式(1)中、nが3である請求項1又は2
に記載の化合物。

【請求項4】請求項1ないし3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5】請求項1ないし3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】



[式(2)中、
R¹およびR²は枝分かれしていてもよい炭素数1 - 13
のアルキル基、又はシクロヘキシル基若しくはベンジル
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6】請求項4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
反応性を示す抗体又はそのフラグメント。

【請求項7】モノクローナル抗体である、請求項6に記
載の抗体又はフラグメント。

【請求項8】寄託番号FERM P - 17739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DBP3 - 42である、請求項6若しくは7に記
載の抗体又はフラグメント。

【請求項9】請求項6ないし9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10】寄託番号FERM P - 17739で寄
託されている請求項9に記載のハイブリドーマ。

【請求項11】請求項6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。

【請求項12】さらに、請求項1ないし3のいずれか1
項に記載の化合物又は請求項4に記載の結合体を用いる
ことを含む、請求項11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、フタル酸エステル
類のハプテン化合物、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。

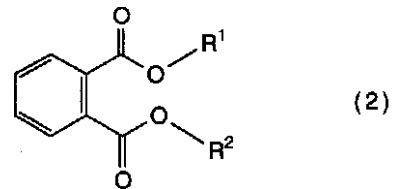
【0003】

【従来の技術】フタル酸エステル類は、以下の式

(2)：

【0004】

【化3】



【0005】[式(2)中、R¹およびR²は枝分かれし
ていてもよい炭素数1 - 13のアルキル基、又はシクロ
ヘキシル基若しくはベンジル基である]で表される構造
を有する、無水フタル酸とアルコールとの反応により合
成されるジエステル化合物(ジアルキルフタレート)の
総称である。フタル酸エステル類は、式(2)中のR¹
およびR²によって、ジブチルフタレート(DBP)
(以下本明細書中、「フタル酸ジブチル」と言う)、ジ
(2 - エチルヘキシル)フタレート(DEHP)、ジイ
ソノニルフタレート(DINP)、ジヘプチルフタレ
ート(DHP)、ジイソデシルフタレート(DIDP)、
ブチルベンジルフタレート(BBP)、ジシクロヘキシ
ルフタレート(DCHP)、ジエチルフタレート(DE
P)等が含まれる。

【0006】フタル酸エステル類は、主にポリ塩化ビニ
ル(Poly Vinyl Chloride, PVC)樹脂を中心としたプラスチックに柔軟性を与える可
塑剤として用いられる他、一部塗料、顔料、接着剤など
にも用いられている。相溶性、可塑性効率、電気絶縁

性、耐水性に優れ、コストパフォーマンスもよいため、日本では全可塑性剤生産量の8割以上を占めている。フタル酸エステル類は、PVCに多いときは40%も加えられるが、樹脂に化学的に結合していないので、時間の経過とともに分離し、大気へ揮発したり水へ溶出したりする。従って、フタル酸エステル類は環境中に広く存在している。このように、フタル酸エステル類は広く環境中に存在する汚染物質で、その上、脂溶性で、いくらか動物脂肪中に残留する。にもかかわらず、従来は毒性（有害性）がそれほど高くはないと考えられており、あまり問題とされていなかった。

【0007】しかしながら、フタル酸エステル類はその使用量が多いため環境（空気、水、土壌）や生物からは常に検出され、分布が普遍的である。また、プラスチックという難分解性の製品中に組み込まれているため、廃棄方法の如何によっては、永続的な汚染をもたらす可能性がある。

【0008】また、最近、フタル酸エステル類のエストロゲン様活性が発見され、従来からフタル酸エステル類の催奇形性、生殖毒性の報告があったことから、「外因性内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）」の疑いがある物質として注目を集めることとなった。環境庁のリストでも8種類のフタル酸エステル類が挙げられている（「環境ホルモン・環境汚染懸念化学物質 - 現状と産業界の対応 -」第71頁 - 第78頁、第280頁 - 第285頁、1999.3.1発行、(株)シー・エム・シー；「環境ホルモンのモニタリング技術 - 分析・測定法の実際 -」第163頁 - 第171頁、1999.1.15発行、(株)シー・エム・シー）。

【0009】「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）。

【0010】食品の安全性確保の上から、食品中の濃度

の実体を把握し、摂取量の推定及びリスク評価を行うことが求められている。しかしながら、フタル酸エステル類は実験室環境や分析に使用する器具、試薬等を広範囲に汚染していることが知られており、食品中の微量でかつ正確な測定は困難であった。

【0011】従来、フタル酸エステル類は、例えば水質試料、食品等から抽出した後、ガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）の選択イオン検出（SIM）法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、酢酸エチル - ヘキサン、次いで、ヘキサン - 飽和アセトニトリルで分配した後に、フロリジルカラムクロマトグラフィーで精製後、GC/MS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・測定法の実際 -」；上述）。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。フタル酸エステル類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。

【0012】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。

【0013】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。

【0014】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、フタル酸エステル類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。

【0015】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。

【0016】フタル酸エステル類については、Fresenius J. Anal. Chem. (1993) 345, p. 589 - 591に抗体およびその作成方法が記載されているが、酵素標識の免疫化学測定法ではなく、蛍光物質を標識とした免疫化学測定法を採用しており、高価な分析装置を必要とする。また、酵素標識の免疫化学測定法については、免疫化学測定法研究会年報2000年第4号第86頁にフタル酸エステル定量キットの記載があり、その定量範囲は200 μ g/lないし4000 μ g/lである。

【0017】しかしながら、フタル酸エステル類を高感度かつ安価に測定できる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は、本発明前には得られていなかった。

【0018】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、フタル酸エステル類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_b断片等を意味する。

【0019】本発明はその一態様において、フタル酸エステル類に反応性を有するモノクローナル抗体を提供する。

【0020】本発明は、また、フタル酸エステル類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（フタル酸エステル類ハプテン）を提供することを目的とする。

*【0021】本発明は、さらに、フタル酸エステル類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。

【0022】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。

【0023】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/又は前記フタル酸エステル類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み、フタル酸エステル類の免疫化学的測定方法を提供することを目的とする。

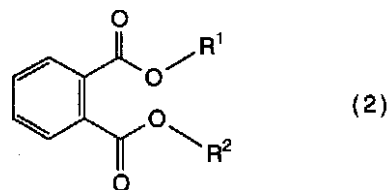
【0024】

【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、フタル酸エステル類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、フタル酸エステル類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。

【0025】本発明の対象となるフタル酸エステル類は、以下の式(2)：

【0026】

【化4】

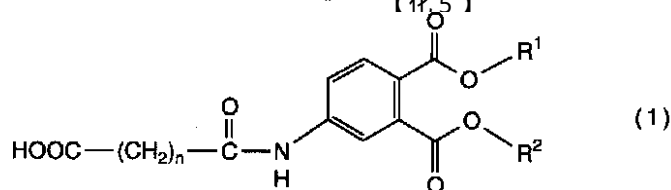


【0027】[式(2)中、R¹およびR²は枝分かれしていてもよい炭素数1 - 13のアルキル基、又はシクロヘキシル基若しくはベンジル基である]で表される構造を有する化合物である。R¹とR²は、同一であっても異なってもよい。特に好ましくは、本発明の対象となるフタル酸エステル類はR¹およびR²がブチル基であるフタル酸ジブチルである。

【0028】本発明の抗体は、例えば、フタル酸エステル類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)：

【0029】

【化5】



【0030】[式(1)中、R¹およびR²は枝分かれしていてもよい炭素数1 - 13のアルキル基、又はシクロヘキシル基若しくはベンジル基であり；そして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。

【0031】式(1)中、好ましくは、 R^1 および R^2 はブチル基である。式(1)中、 n は好ましくは3である。

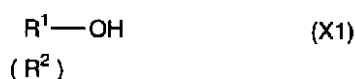
【0032】本発明は、前記ハプテン化合物、ハプテン化合物と高分子化合物との結合体、フタル酸エステル類に反応する抗体及びその作製方法、並びに該ハプテン化合物又は該抗体を用いるフタル酸エステル類の免疫化学的測定方法に関する。

【0033】フタル酸エステル類ハプテンの作製
式(1)で表されるフタル酸エステル類ハプテンは、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。

【0034】まず、例えば、 R^1 および R^2 が同一の場合、無水ニトロフタル酸に以下の式(X1)：

【0035】

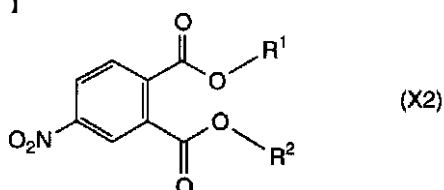
【化6】



【0036】[式(X1)中、 R^1 及び R^2 は、先に定義した通りである]で表される構造を有するアルコールを反応させて、以下の式(X2)：

【0037】

【化7】



【0038】[式(X2)中、 R^1 及び R^2 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。

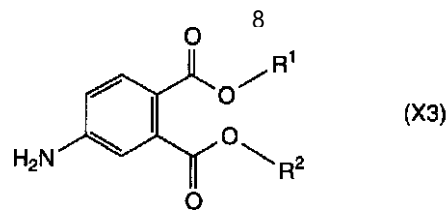
【0039】反応は、ベンゼン、トルエン、キシレンなどの非極性溶媒中、溶媒を環流させ不要の水を取り除きながら行うのが好ましい。

【0040】反応は、20 から溶媒の沸点の温度、好ましくは50 から150 で、5分から20時間、好ましくは30分から5時間行う。

【0041】次いで、有機溶媒中、パラジウム炭素、ロジウム炭素またはラー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)：

【0042】

【化8】

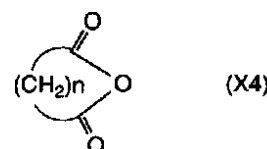


【0043】[式(X3)中、 R^1 及び R^2 は、先に定義した通りである]で表される構造を有する化合物を得る。反応は、0 から溶媒の沸点の温度、好ましくは20 から80 で、5分から20時間、好ましくは30分から5時間行う。有機溶媒としては、エタノール、メタノール、ジオキサン、酢酸等を使用できる。

【0044】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)：

【0045】

【化9】



【0046】[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50 から150 で、5分から30時間、好ましくは3時間から5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。

【0047】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。

【0048】フタル酸エステル類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タル酸エステル類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。

【0049】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。

【0050】フタル酸エステル類ハブ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 l a n g e r e t a l . : J . B i o l . C h e m . 2 3 4 1 0 9 0 1 0 9 4 (1 9 5 4)) 又は活性化エステル法(A. E. KARU e t a l . : J . A g r i c . F o o d C h e m . 4 2 3 0 1 - 3 0 9 (1 9 9 4)) 等の公知の方法によって行うことができる。

【0051】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-パ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ブテン-高分子化合物結合体が製造される。ショッテン-パ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-パ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ゲン化炭化水素類としては、例えばクロロ酢酸メチル、プロモ酢酸メチル、クロロ酢酸エチル、プロモ酢酸エチル、クロロ酢酸イソブチル等が挙げられる。当該方法におけるハブ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。

【0052】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、ハブ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-ヒドロキシコハク酸イミドと反応させ、N-ヒドロキシコハク酸イミド活性化エステルを生成させる。

【0053】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。反応に使用するハブテン化合物とN-ヒドロキシコハク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。

【0054】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、当該アミノ基とハブ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、フタル酸エステル類ハブテンと高分子化合物との結合体を得ることができる。

【0055】また、上記と同様の方法により、酵素等の標識物質をフタル酸エステル類ハブ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。

【0056】ポリクローナル抗体の作製

フタル酸エステル類ハブ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、フタル酸エステル類ハブテンと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。

【0057】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。

【0058】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、フタル酸エステル類と反応するポ

リクローナル抗体の存在を評価することができる。

【0059】モノクローナル抗体の作製

フタル酸エステル類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。

【0060】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タル酸エステル類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。

【0061】以下、本発明のフタル酸エステル類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。

【0062】(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。

【0063】(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。

【0064】(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 (1977)), P3/NSI-1-Ag4-1(NS-1) (Eur. J. Immunol., 6, 511-519 (1976)), Sp2/0-Ag14(Sp2/0) (Nature, 276, 269-270 (1977))、

FO (J. Immunol. Meth., 35, 1-21 (1980)), MPC-11, X63.653, S194等の骨髓腫細胞、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。

【0065】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。

【0066】(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。

【0067】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。

【0068】(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、フタル酸エステル類に対する抗体活性を測定する。

【0069】さらに、測定によりフタル酸エステル類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。

【0070】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、抗フタル酸エステル類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

M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。

【0071】(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。

【0072】これらにより得られた培養上清液あるいは10腹水液を抗フタル酸エステル類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タル酸エステル類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。

【0073】以上のようにして得られた抗フタル酸エス20テル類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。

【0074】抗体によるフタル酸エステル類の測定

本発明で使用する抗体によるフタル酸エステル類の測定法としては、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、ブランク法、スポット法、凝集法、オクタロニー(Ouchterlony)等の30一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。

【0075】フタル酸エステル類の測定は、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。

【0076】(a)まず、固相化用抗原であるフタル酸エステル類ハプテンと高分子化合物との結合体を担体に40固相化する。

【0077】(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。

【0078】(c)これに各種濃度のフタル酸エステル類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タル酸エステル類に競合的に反応させて、固相化抗原-抗体複合体及び、フタル酸エステル類-抗体複合体を生成させる。

【0079】(d)固相化抗原-抗体複合体の量を測定50

することにより、予め作成した検量線から試料中のフタル酸エステル類の量を決定することができる。

【0080】(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。

【0081】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。

【0082】なお、担体に固相化させる抗原としては、抗体を作製したフタル酸エステル類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R¹、R²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。さらに、式(1)に含まれない他のフタル酸エステル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。

【0083】(b)工程のブロッキングは、抗原(フタル酸エステル類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、フタル酸エステル類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。

【0084】次いで(c)工程において、フタル酸エステル類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タル酸エステル類と反応させることにより、固相化抗原-抗体複合体及びフタル酸エステル

類 - 抗体複合体が生成する。

【0085】この際、抗体としては、第一抗体として本願発明のフタル酸エステル類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。

【0086】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。

【0087】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。

【0088】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タル酸エステル類の量を算出することができる。

【0089】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。

【0090】フタル酸エステル類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。既知の濃度のフタル酸エステル類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、試料中のフタル酸エステル類の濃度を算出できる。

【0091】あるいはフタル酸エステル類の測定は、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。

【0092】(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。

【0093】(c)上記工程とは別に、各種濃度のフタル酸エステル類を含む試料に、フタル酸エステル類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。

【0094】(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タル酸エステル類の量を決定する。

【0095】(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。

【0096】(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タル酸エステル類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。

【0097】(c)工程において用いる酵素結合ハプテンの調製は、フタル酸エステル類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、フタル酸エステル類を含む試料と混合する。

【0098】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タル酸エステル類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R¹、R²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。さらに、式(1)に含まれない他のフタル酸エステル類似化合物も、標識用抗原として使用可能である。

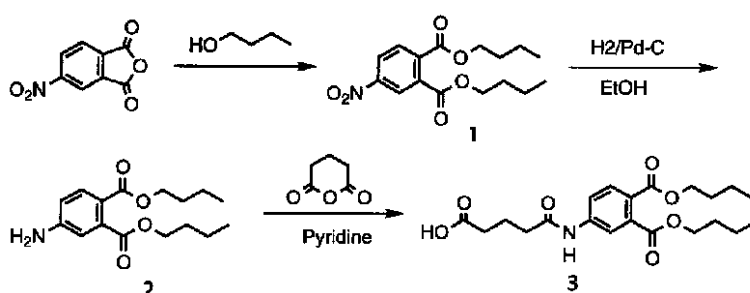
【0099】(d)工程においてフタル酸エステル類を含む試料及び酵素結合ハプテンを抗体固相化担体に接触させ、フタル酸エステル類と酵素結合ハプテンとの競合

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。フタル酸エステル類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。

【0100】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タル酸エステル類の量を算出することができる。

【0101】本発明のモノクローナル抗体DBP3-42は、直接競合ELISA法で0.01μg/mlないし5.0μg/ml、好ましくは約0.01μg/mlないし1.0μg/mlの濃度範囲でフタル酸ジブチルと反応する(実施例8及び図1)。また、モノクローナル抗体DBP3-42は、0.1μg/mlないし100μg/ml、好ましくは0.1μg/mlないし10μg/mlの濃度範囲でフタル酸ベンジルブチル、フタル酸ジイソブチルと反応する(実施例9及び図

反応式



【0106】4-アミノフタル酸ジ*n*-ブチル(2)の合成

無水4-ニトロフタル酸3.0g(15mmol)と1-ブタノール2.4g(33mmol)の混合物を環流下に3時間撹拌した。反応混合物にトルエン50mlと2滴の硫酸を加えた後、ディーンスタークで水を取り除きながら3時間環流した。有機層を水、5% NaOH水溶液、水の順に洗い、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、濃縮した。残渣(1)を50mlのエタノールに溶解し、この溶液に10%パラジウム炭素50mgを加え、反応が集結するまで水素ガスを吹き込んだ。反応混合物を濾過、濾液を濃縮し4.0g(粗収率96%)の(2)を得た。

【0107】3',4'-ビス(*n*-ブトキシカルボニル)グルタルアニリド酸(3)の合成

ピリジン25ml中の4-アミノフタル酸ジ*n*-ブチル(2)1.2g(4mmol)と無水グルタル酸0.50g(4.4mmol)の混合物を環流下で4時間撹拌した。反応混合物を濃縮し、残渣に30mlの水を加

*2)。

【0102】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。

【0103】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。例えば、モノクローナル抗体DBP3-42は他の類似化合物のフタル酸ベンジルブチルに約9%、フタル酸ジイソブチルに約6.5%の交差反応性を有し、フタル酸ジエチルヘキシルに反応性を示さない(実施例9、図2)。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制限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。

【0104】

【実施例】実施例1 フタル酸ジブチルハプテンの合成

【0105】

【化10】

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=1:10:1)で精製し1.5g(収率94%)の(3)を得た。

【0108】上記フタル酸ジブチルハプテン(3)の¹H-NMRによる物性データ(ケミカルシフト)を以下に示す。

【0109】

【表1】¹H-NMR(DMSO-D₆, 400MHz)

0.92(6H, t, 2CH₃), 1.37(4H, m, 2CH₂), 1.63(4H, m, 2CH₂), 1.82(2H, m, CH₂), 2.29(2H, t, CH₂), 2.41(2H, t, CH₂), 4.21(4H, m, 2CH₂), 7.77(2H, m, 2Ar:H), 7.94(1H, d, Ar:H), 10.36(1H, s, NH), 12.09(1H, s, COOH)

実施例2 免疫用抗原の作製

免疫用抗原としてフタル酸ジブチルハブテンとKLHとの結合体を以下のように混合酸無水物法により作製した。

【0110】実施例1で作製したフタル酸ジブチルハブテンの7mgを無水ジオキサン0.7mlに溶解し、10-12に冷却した後、トリ-N-ブチルアミン4μlおよびクロロコハク酸イソブチル24μlを添加し、10ないし12にて30分間攪拌した(以下これを「A液」という)。

【0111】一方、蒸留水1mlにKLHを20mg溶解し、0.5%NaHCO₃ pH9.4を外液として一晚透析した。透析後3000rpm、30分間遠心し得られた上清1.5mlにA液をゆっくり添加した。4

にて2時間反応させた後、スパーテル1杯のグリシンを添加してさらに4にて30分間攪拌することにより反応を終了させた。この反応液を145mM NaCl-10mM PBS(pH7.4)中で1週間透析して得たフタル酸ジブチルハブテンとKLHとの結合体(以下、「フタル酸ジブチルハブテン/KLH」と言う)20を免疫用抗原として用いた。

【0112】実施例3 スクリーニング用抗原の作製

実施例2と同様の方法を用いて、フタル酸ジブチルハブテンとBSAとの結合体(以下、「フタル酸ジブチルハブテン/BSA」と言う)を作製し、スクリーニング用抗原として用いた。

【0113】実施例4 免疫感作

実施例2で作製した免疫用抗原(フタル酸ジブチルハブテン/KLH)100μgをPBS100μlに溶解し、等量のフロイント完全アジュバントと混合した後、30Balb/cマウスに接種した。初回免疫後14日目、31日目、58日目、79日目にフロイント不完全アジュバントを用いて前記と同様に調製した免疫用抗原を、マウスに追加免疫した。また、115日後にはPBSに溶解した免疫抗原をマウスに追加免疫した。122日後に、免疫したマウスの尾静脈より採血を行い、血清を分離しこれを抗血清とした。

【0114】実施例5 抗血清のフタル酸ジブチルに対する反応性

実施例3で調製したスクリーニング用抗原(フタル酸ジブチルハブテン/BSA)を用いた間接競合ELISA法により、実施例4で調製した抗血清のフタル酸ジブチルに対する反応性を調べた。

【0115】まず、実施例3で調製したフタル酸ジブチルハブテン/BSAの溶液(5μg/ml)を100μl/ウェルにて96ウェルプレートにコーティングした。洗浄の後、4倍に希釈したブロックエース(「Block Ace」:大日本製薬、コードNo.UK-25B)でブロッキングした後、抗血清の1000倍希釈液と各種濃度のフタル酸ジブチルあるいはその類似化合

物を含む10%メタノール溶液とを等量混合し、その100μlを各ウェルに入れ、37にて1時間反応させた。

【0116】0.05%Tween20-PBSにて1回洗浄の後、PBSを用いて5000倍希釈したペルオキシダ-ゼ結合抗マウスIgGヤギ抗体(Cappel社製)を100μlずつ各ウェルに添加し、37にて1時間反応させた。0.05% Tween20-PBSにて2回洗浄した後、0.4mg/mlのOPD、及び0.04%過酸化水素を含む0.05Mリン酸クエン酸緩衝液(pH4.5)を100μlずつ各ウェルにいれ室温にて20分間放置し、発色させた。次いで、2N硫酸100μlを各ウェルに加え、反応を停止させた後、490nmの吸光度を測定した。

【0117】実施例6 ハイブリド-マ細胞の作製

実施例4に続き、血清中の抗フタル酸ジブチル抗体の活性が高くなったマウスの脾臓細胞と、マウスミエロ-マ細胞(P3U1)とを電気融合法にて細胞融合をおこなった。細胞増殖が認められた培養上清液について、以下の方法でフタル酸ジブチルに対する抗体活性を調べた。

【0118】フタル酸ジブチルハブテン/BSAの溶液(5μg/ml)を50μl/ウェルにて96ウェルプレートにコーティングした。洗浄の後、4倍に希釈したブロックエースでブロッキングした後、培養上清液と各種濃度のフタル酸ジブチルあるいはその類似化合物を含む10%メタノール溶液とを等量混合し、その100μlをウェルに入れ、37にて1時間反応させた。

【0119】0.05%Tween20-PBSにて1回洗浄の後、PBSを用いて、5000倍希釈したペルオキシダ-ゼ結合抗マウスIgGヤギ抗体(Cappel社製)を50μlずつ各ウェルにて37 1時間反応させた。0.05% Tween20-PBSにて2回洗浄の後、0.4mg/mlのOPD及び0.04%過酸化水素を含む0.05Mリン酸クエン酸緩衝液(pH4.5)を100μlずつ各ウェルにいれ室温にて20分間放置し、発色させた。

【0120】次いで、2N硫酸100μlを各ウェルに加え、反応を停止させた後、490nmの吸光度を測定し、特異性のある抗体活性が認められたものを選抜した。次に、選抜されたウェルの細胞について限界希釈法を用いた細胞クロ-ニングをおこなった。その結果、数株のハイブリド-マが抗フタル酸ジブチル抗体を産生するハイブリド-マ細胞としてクロ-ン化された。そのうちのDBP3-42を平成12年2月22日に寄託番号FERM P-17739として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。

【0121】実施例7 フタル酸ジブチルハブテンとHRPとの結合体の作製

実施例2と同様の方法を用いて、フタル酸ジブチルハブ

テンとHRPとの結合体（以下、「フタル酸ジブチルハブテン/HRP」と言う）を作製した。

【0122】1mgのフタル酸ジブチルハブテンを無水ジオキサン0.2mlに溶解した後、トリ-N-ブチルアミン0.5μl、クロロ蟻酸イソブチル0.3μlを添加し、10-12にて30分間撹拌した。（以下、これを「B液」とする）。一方、0.5%NaHCO₃をNaOHでpH9.4に調整した溶液1mlにHRP5mgを溶解し、B液をこの中に滴下した。4にて2時間撹拌し、さらにグリシンを添加して30分間撹拌することにより反応を終了させた。反応物をPBSにて透析することにより、フタル酸ジブチルハブテンとHRPとの結合体（以下、「フタル酸ジブチルハブテン/HRP」と言う）を得た。

【0123】実施例8 直接競合ELISA法によるフタル酸ジブチルの測定

実施例6で得られたハイブリド-マ細胞（DBP3-42）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を精製した。（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。）このモノクローナル抗体DBP3-42を用いて直接競合ELISA法にてフタル酸ジブチルを測定した。

【0124】上記のDBP3-42抗体溶液（2μg/ml）を100μl/ウェルで96ウェルプレートに加え、4で一晩静置し、翌日4倍希釈したブロックエースでブロッキングし、アッセイ用のプレートを作製した。各種濃度のフタル酸ジブチルを含む10%メタノール溶液と、実施例7で作製したフタル酸ジブチルハブテン/HRPを適度に希釈したPBS溶液との等量混合液を50μlずつ各ウェルに入れ、37で1時間反応させた。

【0125】反応後、0.05%Tween20-PBSにて2回洗浄した後、0.4mg/mlのOPD及び*

*0.04%過酸化水素を含む0.05Mリン酸クエン酸緩衝液（pH4.5）を100μlずつ各ウェルに入れ、室温にて20分間放置し、発色させた。

【0126】次に、2N硫酸を100μlずつ各ウェルに加え、発色反応を停止させた後、490nmの吸光度を測定した。この結果を図1に示す。直接競合ELISA法において、本発明のモノクローナル抗体DBP3-42は、フタル酸ジブチルを0.01μg/mlないし5μg/mlの濃度範囲で測定することができた。

【0127】実施例9 モノクローナル抗体の交差反応性

ハイブリド-マDBP3-42の産生するモノクローナル抗体DBP3-42について実施例8と同様の方法を用いてフタル酸ジブチルおよび他の類似化合物に対する交差反応性を調べた。その結果を図2に示す。

【0128】モノクローナル抗体DBP3-42は類似化合物のフタル酸ベンジルブチルに約9%、フタル酸ジイソブチルに約6.5%の交差反応率を示したが、フタル酸ジエチルヘキシルに対しては反応性を示さなかった。ここで、交差反応率は次式で定義される。

【0129】

【化11】交差反応率(%) = (フタル酸ジブチルのIC₅₀/対象化合物のIC₅₀) × 100

また、IC₅₀(μg/ml)は、フタル酸ジブチル等の化合物を添加しない反応溶液の吸光度に対して吸光度を50%減少させる反応溶液中の対象化合物の濃度を示す。

【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DBP3-42の直接競合ELISA法によるフタル酸ジブチルの測定を示す。

【図2】図2はモノクローナル抗体DBP3-42を用いた直接競合ELISA法によるフタル酸ジブチルおよび他の類似化合物の測定を示す。

【図1】

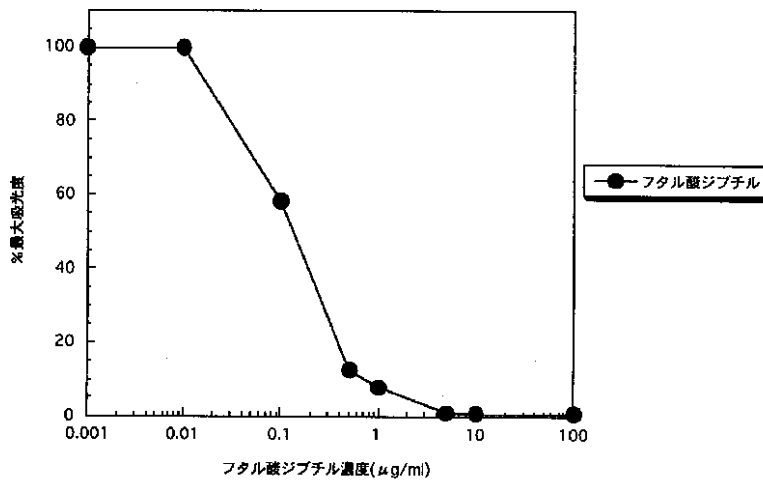


図1. モノクローナル抗体DBP3-42を用いた直接競争ELISA法によるフタル酸ジブチルの測定

【図2】

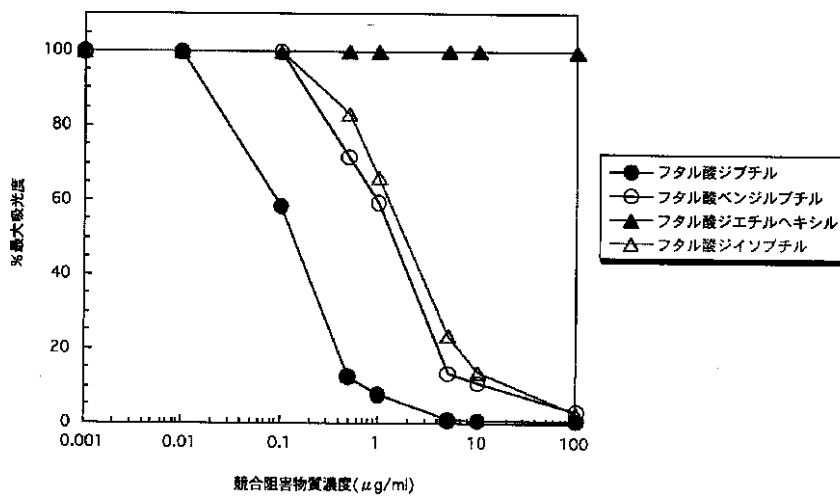


図2. モノクローナル抗体DBP3-42の交差反応性

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

G 0 1 N 33/577

//(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

識別記号

F I

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

C 1 2 N 5/00

テ-マコード (参考)

B

(72)発明者 渡辺 和明

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 香川 康浩

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

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA16
4B065 AA92X AB05 BA08 CA25
CA44 CA54
4H006 AA01 AB20 BJ50 BS10 BT32
BV25
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA42
DA76 DA86 EA50 FA72

专利名称(译)	邻苯二甲酸酯的化合物，抗体和测量方法		
公开(公告)号	JP2001272401A	公开(公告)日	2001-10-05
申请号	JP2000084393	申请日	2000-03-24
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 金井正三 渡辺和明 香川康浩		
发明人	伊東 茂壽 金井 正三 渡辺 和明 香川 康浩		
IPC分类号	G01N33/53 C07C233/54 C07K16/44 C12N5/10 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/577		
FI分类号	G01N33/53.J C07C233/54 C07K16/44 C12P21/08 G01N33/577.B C12R1/91 C12N5/00.B C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA16 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA54 4H006/AA01 4H006/AB20 4H006/BJ50 4H006/BS10 4H006/BT32 4H006/BV25 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA42 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA72		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的目的是提供邻苯二甲酸酯的半抗原化合物，抗体和测定方法。
本发明的半抗原化合物具有其中间隔臂和用于结合的官能团与邻苯二甲酸酯或其一部分共价结合的结构。

