

(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2002 - 128800

(P2002 - 128800A)

(43)公開日 平成14年5月9日(2002.5.9)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
C 0 7 K 16/44		C 0 7 K 16/44	4 B 0 2 4
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 4
15/02		G 0 1 N 33/53	S 4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/08		C 0 7 K 14/435	4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/53		14/76	

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 15数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 318770(P2000 - 318770)

(22)出願日 平成12年10月19日(2000.10.19)

(71)出願人 000105567

コスモ石油株式会社

東京都港区芝浦1丁目1番1号

(74)上記1名の代理人 100089705

弁理士 社本 一夫 (外6名)

(71)出願人 000155023

株式会社堀場製作所

京都府京都市南区吉祥院宮の東町2番地

(74)上記1名の代理人 100089705

弁理士 社本 一夫 (外5名)

(72)発明者 宗像 浩

埼玉県幸手市権現堂1134 - 2 株式会社コス

モ総合研究所研究開発センター内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 トリブチルスズ化合物の抗体及び測定方法

(57)【要約】

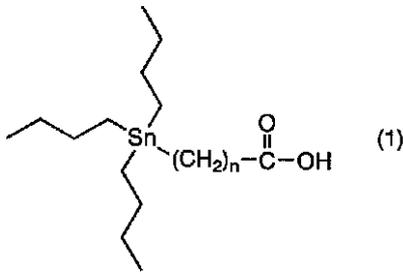
【課題】 本発明は、トリブチルスズ化合物の抗体及び測定方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 本発明の抗体は、トリブチルスズ化合物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トリブチルスズ誘導体をハブテンとして使用することにより得られる。

【特許請求の範囲】

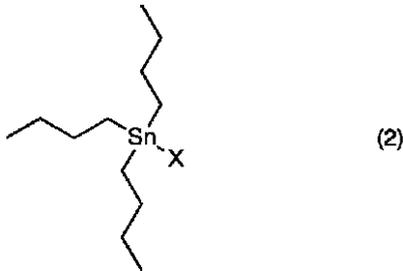
【請求項1】以下の式(1)：

【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、式(1)または以下の式(2)：

【化2】



[式(2)中、Xは、F、Cl、Br及び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、CH<sub>3</sub>COO、ClCH<sub>2</sub>COO、CH<sub>2</sub>=CH(CH<sub>3</sub>)COO、CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-COO、(c-C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>)COO、(n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>SnOCO-CH=CH-COO、(n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>SnOCO-CHBr-CHBr-COO、(n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>SnOCO-(c-C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>)-COO、(n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>SnOCO-Ph-COO、NH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub>、CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>、(n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>Sn-O、CH<sub>3</sub>O、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O、PhO、PhS、N=C=S、(n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>Sn、(n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>Sn-C≡C、CH<sub>2</sub>=CH、CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>、Ph、2-フリル基、2-チエニル基、Ph-COO及び1, 2, 3, 4, 4a, 4b, 5, 6, 10, 10a-デカヒドロ-7-イソプロピル-1, 4a-ジメチル-1-フェナントレンカルボキシ基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(1)または式(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(1)または式(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-18036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Sn3J1-8-1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-18036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(1)または式(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。

【請求項9】請求項1において式(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。

20 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】トリブチ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。

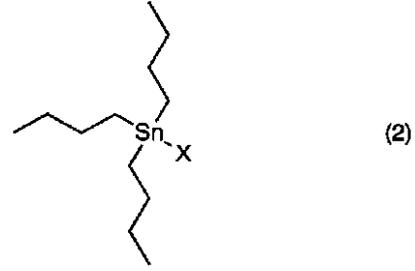
【0002】本発明はさらに、前記抗原、抗体及びそのフラグメントを用いた免疫化学的測定方法に関する。

【0003】

【従来の技術】トリブチルスズ化合物は、以下の式(2)：

30 【0004】

【化3】



【0005】[式(2)中、Xは、F、Cl、Br及び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、CH<sub>3</sub>COO、ClCH<sub>2</sub>COO、CH<sub>2</sub>=CH(CH<sub>3</sub>)COO、CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-COO、(c-C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>)COO、(n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>SnOCO-CH=CH-COO、(n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>SnOCO-CHBr-CHBr-COO、(n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>SnOCO-(c-C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>)-COO、(n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>SnOCO-Ph-COO、NH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub>、CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>、(n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>Sn-O、CH<sub>3</sub>O、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O、PhO、PhS、N=C=S、(n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>S

n、 $(n-C_4H_9)_3Sn-C$ 、 $CH_2=CH$ 、 $CH_2=CH-CH_2$ 、Ph、2-フリル基、2-チエニル基、Ph-COO及び1, 2, 3, 4, 4a, 4b, 5, 6, 10, 10a-デカヒドロ-7-イソプロピル-1, 4a-ジメチル-1-フェナントレンカルボキシ基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。トリブチルスズ化合物は、式(2)中のXによって、フッ化トリブチルスズ、塩化トリブチルスズ、臭化トリブチルスズ、ヨウ化トリブチルスズ、水素化トリブチルスズ、酢酸トリブチルスズ、クロロ酢酸トリブチルスズ、メタクリル酸トリブチルスズ、ラウリン酸トリブチルスズ、シクロペンタンカルボン酸トリブチルスズ、フマル酸ビス(トリブチルスズ)、マレイン酸ビス(トリブチルスズ)、2, 3-ジブロモコハク酸ビス(トリブチルスズ)、シクロペンタンジカルボン酸ビス(トリブチルスズ)、フタル酸ビス(トリブチルスズ)、スルファミン酸トリブチルスズ、トリフルオロメタンスルホン酸トリブチルスズ、ビス・トリブチルスズ・オキシド、トリブチルスズメトキシド、トリブチルスズエトキシド、トリブチルスズフェノキシド、フェニルトリブチルスズスルフィド、シアン化トリブチルスズ、トリブチルスズイソシアシアネート、ビストリブチルスズ、ビス(トリブチルスズ)アセチレン、トリブチルビニルスズ、アリルトリブチルスズ、トリブチルフェニルスズ、2-トリブチルスズフラン、2-トリブチルスズチオフェン、安息香酸トリブチルスズ、アビエチン酸トリブチルスズ等が知られている(以下、これらのトリブチルスズ化合物を総称して「トリブチルスズ」ということがある)。

【0006】トリブチ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)。

【0007】トリブチ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、雄性生殖器官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トラ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。

【0008】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、他のトリブチルスズ化合物13物質およびトリフェニルスズ化合物の7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)。

【0009】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、トリブチルスズ化合物およびトリフェニ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ブチ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。

【0010】また、国際海事機関（IMO）では、有機スズ汚染の主原因の一つである有機スズ含有船底塗料の全廃条約の策定を1999年11月に決議し、2003年より有機スズ含有塗料の新規塗布の禁止、2008年より全面廃止とすることを決定した。条約の確実な施行の為に、船舶の入港時において船底塗料中に有機スズが使用されているかどうかを簡便・迅速に測定する方法が求められている。

【0011】従来、トリブチ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ブチルスズはTBT O換算値、トリフェニルスズは塩化トリフェニルスズ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<sub>4</sub>）によるエチル化、四水素化ホウ酸ナトリウム（NaBH<sub>4</sub>）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・測定法の実際 -」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。トリブチ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。

【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 bi

ochemistry 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、トリブチ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。

【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】トリブチルスズについては、その必要性が非常に高かったにもかかわらず、本発明前には抗体は全く得られていなかった。

【0017】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、トリブチ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、例えばF<sub>a</sub>b断片等を意味する。

【0018】本発明はその一態様において、トリブチ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、トリブチ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（トリブチルスズハプテン）を提供することを目的とする。

【0019】本発明は、さらに、トリブチ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。

【0020】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/又は前記トリブチルスズハブ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、トリブチ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。

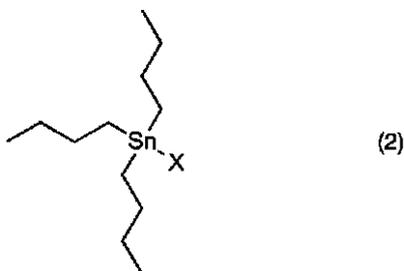
【0021】

【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、トリブチルスズ又はその部分にスパ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、トリブチルスズの誘導体をハブ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。  
【0022】本発明の対象となるトリブチルスズ化合物は、以下の式(2)

【0023】

【化4】



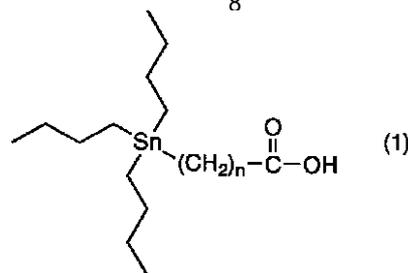
【0024】[式(2)中、Xは、F、Cl、Br及びIからなるグループから選択されるハロゲン原子であるか、あるいは、H、CH<sub>3</sub>COO、ClCH<sub>2</sub>COO、CH<sub>2</sub>=CH(CH<sub>3</sub>)COO、CH<sub>3</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-COO、(c-C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>)COO、(n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>SnOCO-CH=CH-COO、(n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>SnOCO-CHBr-CHBr-COO、(n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>SnOCO-(c-C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>)-COO、(n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>SnOCO-Ph-COO、NH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub>、CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>、(n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>Sn-O、CH<sub>3</sub>O、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O、PhO、PhS、N<sub>3</sub>C、S=C=N、(n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>Sn、(n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub>Sn-C≡C、CH<sub>2</sub>=CH、CH<sub>2</sub>=CH-CH<sub>2</sub>、Ph、2-フリル基、2-チエニル基、Ph-COO及び1, 2, 3, 4, 4a, 4b, 5, 6, 10, 10a-デカヒドロ-7-イソプロピル-1, 4a-ジメチル-1-フェントレンカルボキシ基からなるグループから選択される基である]

【0025】本発明の抗体は、例えば、トリブチルスズ化合物の一部分にスパ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ブ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)：

【0026】

【化5】

\*



\*【0027】[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ブテンとして使用する。式(1)中、好ましくは、nは2または3である。

【0028】本発明の抗体およびフラグメントは式(2)の化合物のみならず、式(1)の化合物、および/または式(1)の化合物と高分子化合物との結合体にも結合しうる。

【0029】本発明は、前記ハブテン化合物、ハブテン化合物と高分子化合物との結合体、トリブチルスズに反応する抗体及びその作製方法、並びに該ハブテン化合物又は該抗体を用いるトリブチルスズの免疫化学的測定方法に関する。

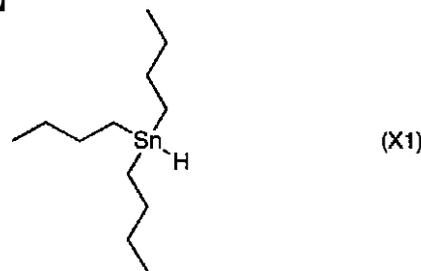
【0030】トリブチルスズハブテンの作製

式(1)で表されるトリブチルスズハブテンは、公知の方法に従って製造することができる。限定するわけではないが、例えば以下のような方法を用いることができる。

【0031】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)：

【0032】

【化6】



【0033】で表される構造を有する水素化トリブチルスズに、以下の式(X2)：

【0034】

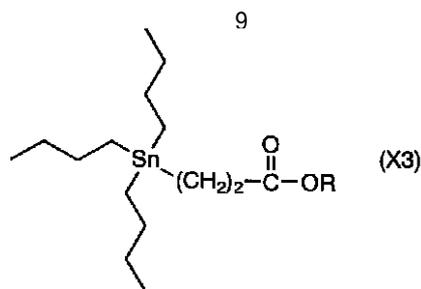
【化7】



【0035】[式(X2)中、Rはカルボキシ基の保護基である]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)：

【0036】

【化8】



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。

【0043】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。

【0044】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。

【0045】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。

【0046】トリブチ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ブチ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。

【0047】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。

【0048】トリブチ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。

【0049】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プテン-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1

【0037】[式(X3)中、R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分から10時間、好ましくは1時間から4時間行う。

【0038】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。

【0039】Rで示されるカルボキシル基の保護基は公知のものでよく、具体例として、例えば、メチル基、エチル基、tert-ブチル基、ベンジル基、p-メトキシベンジル基、3,4-ジメトキシベンジル基、トリクロロエチル基、トリメチルシリル基、tert-ブチルジメチルシリル基、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。

【0040】さらに、式(X3)の化合物からR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。

【0041】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、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン等の有機溶媒に溶解し、次いで塩酸、硫酸、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体、トリフルオロ酢酸、トリフルオロメタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等を加えて、0 から溶媒の沸点の温度、好ましくは0 から50で、5分から10時間、好ましくは1時間から5時間攪拌反応させることにより式(1)の化合物を得ることができる。

【0042】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、1,4-ジオキサン、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分から10時間、好ましくは1時間から

00 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酸エステルとしては、例えばクロロ酢酸メチル、ブromo酢酸メチル、クロロ酢酸エチル、ブromo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プテンとハロゲン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。

【0050】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。

【0051】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。

【0052】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、トリブチ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

きる。

【0053】また、上記と同様の方法により、酵素等の標識物質をトリブチ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、<sup>32</sup>P、<sup>125</sup>I等の放射性物質、化学発光物質などがある。

#### 【0054】ポリクローナル抗体の作製

トリブチ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、トリブチルスズハプテンと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、ウマ等を挙げるることができる。ただし、ヒトは含まれない。

【0055】免疫の際の投与方法は、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、トリブチ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。

【0056】本発明においてトリブチ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法において約1µg/mlないし100µg/mlの濃度でトリブチルスズと反応できる(実施例5、図1)。

#### 【0057】モノクローナル抗体の作製

トリブチ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。

【0058】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ブチ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) ミエローム細胞の調製

(e) 抗体産生細胞とミエローム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-

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。

以下、本発明のトリプチ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。

【0059】(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。

(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。

【0060】(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、Ba1b/cマウス由来骨髄腫細胞株のP3/X63-Ag8(X63)(Nature, 256, 495-497(1975))、P3/X63-Ag8.U1(P3U1)(Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7(1987))、P3/NSI-1-Ag4-1(NS-1)(Eur. J. Immunol., 6, 511-519(1976))、Sp2/0-Ag14(Sp2/0)(Nature, 276, 269-270(1978))、FO(J. Immunol. Meth., 35, 1-21(1980))、MPC-11、X63.653、S194等の骨髄腫株化細胞、あるいはラット由来の210.RCY3.Ag1.2.3.(Y3)(Nature, 277, 131-133, (1979))等を使用できる。

【0061】上述したミエローマ細胞をウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)又はイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)で継代培養し、融合当日に約 $1 \times 10^6$ 以上の細胞数を確保する。

【0062】(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。

【0063】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。

【0064】(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、トリプチルスズに対する抗体活性を測定する。

【0065】さらに、測定によりトリプチ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。

【0066】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、抗トリプチ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。

【0067】(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Ba1b/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。

【0068】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プチ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プチ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。

【0069】以上のようにして得られた抗トリブチ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。

#### 【0070】抗体によるトリブチルスズの測定

本発明で使用する抗体によるトリブチ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、ブランク法、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(「ハイブリドマ法とモノクローナル抗体」、株式会社R&Dプログラミング発行、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。

【0071】トリブチルスズの測定は、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ブチ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。

(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ブチ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ブチ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、トリブチルスズ-抗体複合体を生成させる。

(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ブチルスズの量を決定する。

【0072】(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。

【0073】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 $\mu$ g/mlから100 $\mu$ g/ml程度、好ましくは0.05 $\mu$ g/mlから5 $\mu$ g/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 $\mu$ l/ウェル以下で20 $\mu$ l/ウェルから150 $\mu$ l/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。

【0074】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ブチ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ブチ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。

【0075】(b)工程のブロッキングは、抗原(トリブチ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、トリブチ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、カゼイン、カゼインナトリウム等を使用できる。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。

【0076】次いで(c)工程において、トリブチ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ブチ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ブチルスズ-抗体複合体が生成する。

【0077】この際、抗体としては、第一抗体として本願発明のトリブチ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。

【0078】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。

【0079】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0.5-2.0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。

【0080】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ブチルスズの量を算出することができる。

【0081】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、490nm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。

【0082】既知濃度のトリブチルスズを添加した反応液の吸光度により予め作成しておいた検量線を用いて、試料中のトリブチルスズの濃度を算出できる。本発明のモノクローナル抗体Sn3J1-8-1は、間接競合ELISA法において約0.03µg/mlないし約10µg/ml、好ましくは約0.1µg/mlないし約30µg/mlの濃度範囲でトリブチルスズと反応する(実施例7、図2)。

【0083】あるいはトリブチルスズの測定は、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。

(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、各種濃度のトリブチルスズを含む試料に、トリブチ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。

(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、予め作成した検量線から試料中のトリブチルスズの量を決定する。

【0084】(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。

【0085】(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ブチ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。

【0086】(c)工程において用いる酵素結合ハプテンの調製は、トリブチ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、トリブチルスズを含む試料と混合する。

【0087】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ブチ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ブチルスズ化合物も、標識用抗原として使用可能である。

【0088】(d)工程においてトリブチルスズ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、トリブチ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。トリブチ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。

【0089】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ブチルスズの量を算出することができる。

【0090】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。

【0091】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以下の手順により算出することができる。(a)交差反

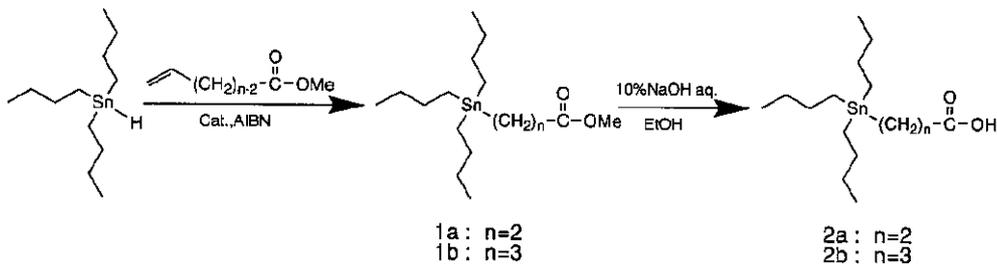
応性を検討する化合物を添加しない反応溶液の吸光度に  
対して、それらを添加して抗体と反応させた溶液の吸光  
度の減少率を阻害率として次式により計算する。<sup>\*</sup>

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

【0093】(b) 阻害率が50%となる濃度を50%  
阻害濃度として、塩化トリブチルスズに対する反応性を

$$\text{交差反応性}[\%] = \frac{\text{塩化トリブチルスズの50\%阻害濃度}}{\text{各化合物の50\%阻害濃度}} \times 100$$

【0095】例えば、本発明のモノクローナル抗体Sn  
3J1-8-1は、間接競合ELISA法において、水  
素化トリブチルスズ、フッ化トリブチルスズ、塩化トリ  
ブチルスズ、臭化トリブチルスズ、ヨウ化トリブチルス  
ズおよび酢酸トリブチルスズの各トリブチルスズ化合物  
には100%の交差反応性を示し、トリブチルスズ基を  
2個有するビス・トリブチルスズ・オキシドに対しては  
200%の交差反応性を示す。すなわち、本発明の抗体  
はトリブチルスズ基と1対1で反応する。また、テトラ  
ブチルスズ、二塩化ジブチルスズ、三塩化ブチルスズ、  
塩化トリプロピルスズ、塩化トリメチルスズにはほとん  
ど反応性を示さないが、塩化トリシクロヘキシルスズに  
は64%、塩化トリフェニルスズには22%の交差反応<sup>\*</sup>  
反応式



### 【0099】3-トリブチルスズプロピオン酸メチル (1a)の合成

水素化トリブチル 1.17 g (4.0 mmol)、アク  
リル酸メチル 0.474 g (5.5 mmol) および  
2,2'-アゾビス(イソブチロニトリル) 3.3 mg  
(0.02 mmol)の混合物を60 で3時間攪拌し  
た。反応混合物を濃縮後、残渣をオクタデシル基結合シ  
リカゲルを充填剤としたカラムクロマトグラフィー(n  
-ヘキサン:エタノール=99:1)で精製し、0.7  
23 g (収率48%)の(1a)を得た。

### 【0100】4-トリブチルスズ酪酸メチル(1b)の 合成

水素化トリブチルスズ 1.17 g (4.0 mmol)、  
3-ブテン酸メチル(純度97%) 0.614 g (5.  
9 mmol) および2,2'-アゾビス(イソブチロニ  
トリル) 3.3 mg (0.02 mmol)の混合物を6  
0 で3時間攪拌した。反応混合物を濃縮後、残渣をオ

\*【0092】  
【化9】

\*り計算する。

【0094】

【化10】

\*性を示す(実施例8、表3)。よって、本発明の抗体は  
トリブチルスズ基に最も良く反応するが、トリシクロヘ  
キシルスズ基、トリフェニルスズ基にも反応性を有す  
る。

【0096】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。

【0097】

【実施例】実施例1 トリブチルスズハブテンの合成

【0098】

【化11】

クタデシル基結合シリカゲルを充填剤としたカラムクロ  
マトグラフィー(n-ヘキサン:エタノール=99:  
1)で精製し、1.02 g (収率65%)の(1b)を  
得た。

### 【0101】3-トリブチルスズプロピオン酸(2a) の合成

3-トリブチルスズプロピオン酸メチル(1a) 0.5  
9 g (1.6 mmol)をエタノール10 mlに溶解  
し、10%(W/W)水酸化ナトリウム水溶液1.28  
g (3.2 mmol)を加え、60 にて1時間攪拌し  
た。減圧下にエタノールを留去し、残渣に1N 塩酸  
3.2 mlを加え、n-ヘキサンで抽出した(30 ml  
×3)。n-ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで乾燥  
後、濃縮した。残渣をオクタデシル基結合シリカゲルを  
充填剤としたカラムクロマトグラフィー(エタノール:  
水=9:1)で精製し、0.55 g (収率95%)の  
(2a)を得た。

【0102】上記トリブチルスズハブテン(2a)の<sup>1</sup>H-NMRによる物性データ(ケミカルシフト)を以下の表1に示す。

【0103】

【表1】<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz)

δ	0.85 (6H, t, CH <sub>2</sub> ×3)
	0.89 (9H, t, CH <sub>3</sub> ×3)
	1.01 (2H, t, CH <sub>2</sub> )
	1.30 (6H, m, CH <sub>2</sub> ×3)
	1.47 (6H, m, CH <sub>2</sub> ×3)
	2.53 (2H, t, CH <sub>2</sub> )
	11.58 (1H, broad, OH)

#### 4-トリブチルスズ酪酸(2b)の合成

4-トリブチルスズ酪酸メチル(1b)0.94g(2.4mmol)をエタノール10mlに溶解し、10%(W/W)水酸化ナトリウム水溶液1.92g(4.8mmol)を加え、60℃にて1時間撹拌した。減圧下にエタノールを留去し、残渣に1N塩酸4.8mlを加え、n-ヘキサンで抽出した(30ml×3)。n-ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、濃縮した。残渣をオクタデシル基結合シリカゲルを充填剤としたカラムクロマトグラフィー(エタノール:水=9:1)で精製し、0.60g(収率66%)の(2b)を得た。

【0104】上記トリブチルスズハブテン(2b)の<sup>1</sup>H-NMRによる物性データ(ケミカルシフト)を以下の表2に示す。

【0105】

【表2】<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz)

δ	0.83 (6H, t, CH <sub>2</sub> ×3)
	0.89 (9H, t, CH <sub>3</sub> ×3)
	1.31 (8H, m, CH <sub>2</sub> ×4)
	1.47 (6H, m, CH <sub>2</sub> ×3)
	1.84 (2H, t, CH <sub>2</sub> )
	2.36 (2H, t, CH <sub>2</sub> )
	11.60 (1H, broad, OH)

#### 実施例2 免疫用抗原の作製

免疫用抗原としてトリブチルスズハブテン(2a)とBSAとの結合体を混合酸無水物法を用いて作製した。

【0106】実施例1で作製した3-トリブチルスズプロピオン酸(2a)3.6mg(10μmol)を1,4-ジオキサン1mlに溶解し、N-メチルモルホリン25μlを添加し、室温で20分間撹拌した。次に、クロロ蟻酸イソブチル10μlを添加し、室温で20分間撹拌した(これを、以下「A液」という)。

【0107】一方、BSA67mg(1μmol)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、撹拌しながら1,4

-ジオキサン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、室温にて一晩、40℃にて1時間反応させた。反応後、30%(V/V)メタノール水溶液にて4℃で透析したものを凍結乾燥し、3-トリブチルスズプロピオン酸とBSAとの結合体(以下、「トリブチルスズプロピオン酸/BSA結合体」という)を調製した。以下、免疫用抗原として用いた。

#### 【0108】実施例3 測定用抗原の作製

10 測定用抗原としてトリブチルスズハブテン(2b)とRSAとの結合体を混合酸無水物法を用いて作製した。

【0109】実施例1で作製した4-トリブチルスズ酪酸(2b)11.3mg(30μmol)を1,4-ジオキサン1mlに溶解し、N-メチルモルホリン25μlを添加し、室温で20分間撹拌した。次に、クロロ蟻酸イソブチル10μlを添加し、室温で20分間撹拌した(これを、以下「B液」という)。

【0110】一方、RSA48mg(1μmol)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、撹拌しながら1,4-ジオキサン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B液を滴下し、室温にて一晩、40℃にて1時間反応させた。反応後、30%(V/V)メタノール水溶液にて4℃で透析したものを凍結乾燥し、4-トリブチルスズ酪酸とRSAとの結合体(以下、「トリブチルスズ酪酸/RSA結合体」という)を調製した。以下、測定用抗原として用いた。

#### 【0111】実施例4 免疫感作

30 免疫にはBalb/cマウスを用いた。実施例2で作製したトリブチルスズプロピオン酸/BSA結合体(免疫用抗原)100μgをPBS100μlに溶解し、等量のフ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100μgとフ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週間後に免疫用抗原50μgをPBS100μlに溶解し、等量のフロイント不完全アジュバンドと混合してマウスの皮下に追加免疫した。また、その2週間後にPBS200μlに溶解した免疫用抗原30μgをマウスの尾静脈又は腹腔に追加免疫した。

#### 【0112】実施例5 抗血清の塩化トリブチルスズに対する反応性の評価

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法にて塩化トリブチルスズを測定し、抗血清を評価した。

【0113】実施例3にて作製したトリブチルスズ酪酸/RSA結合体(測定用抗原)のPBS溶液(0.1μg/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(5 ng / 50 μl / ウェル)、1% (W / V) カゼインナトリウム - PBS 溶液でブロッキングして測定用プレートを作製した。これに抗血清の1800倍希釈液と、各種濃度の塩化トリブチルスズと2 μg / ml のBSA及び20% (V / V) のカゼインナトリウムを溶解した20%メタノール - PBS 溶液とを等量混合し、その50 μl を各ウェルに入れ、25℃で1.5時間反応させた。

【0114】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50 μl / ウェルの量で加え、25℃で1時間反応させた。PBSで5回洗浄した後に、2 mg / ml のOPD及び0.02%の過酸化水素を含む0.1 M クエン酸 - リン酸緩衝液(pH 5.0)を50 μl / ウェルの量で加え、室温にて10分間発色させた。

【0115】次に、1 N 硫酸を50 μl / ウェルの量で加えて発色反応を停止し、490 nm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、塩化トリブチルスズの量を1 μg / ml から100 μg / ml の範囲で測定することができた。

#### 【0116】実施例6 ハイブリドーマの作製

実施例4に続いて、血清中の抗トリブチ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(Sp2/0-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と同様の方法で作製した測定用プレートに20%メタノール - PBS 溶液を50 μl / 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50 μl / ウェルの量で加え、25℃にて2時間反応させた。

【0117】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50 μl / ウェルの量で加え、25℃にて1時間反応させた。PBSで5回洗浄した後に、2 mg / ml のOPD及び0.02%の過酸化水素を含む0.1 M クエン酸 - リン酸緩衝液(pH 5.0)を50 μl / ウェルの量で加え、室温にて10分間発色させた。

【0118】次に、1 N 硫酸を50 μl / ウェルの量で加えて反応を停止し、490 nm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ブチ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ーニ

ングを行った。その結果、数株のハイブリドーマが抗トリブチ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Sn3J1-8-1を平成12年9月14日に、寄託番号FERM P-18036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。

#### 【0119】実施例7 モノクローナル抗体による塩化トリブチルスズの測定

実施例6で得られたハイブリドーマSn3J1-8-1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Sn3J1-8-1抗体を用いて間接競合ELISA法にて塩化トリブチルスズの量を測定した。

【0120】実施例5と同様の方法で作製した測定用プレートに、各種濃度の塩化トリブチルスズを含む20%メタノール - PBS 溶液と上記Sn3J1-8-1抗体のPBS溶液(2 μg / ml)の等量混合液を50 μl ずつ各ウェルに入れ、25℃で1.5時間反応させた。

【0121】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50 μl / ウェルの量で加え、25℃にて1時間反応させた。PBSで5回洗浄した後に、2 mg / ml のOPD及び0.02%の過酸化水素を含む0.1 M クエン酸 - リン酸緩衝液(pH 5.0)を50 μl / ウェルの量で加え、室温にて10分間発色させた。

【0122】次に、1 N 硫酸を50 μl ずつ各ウェルに加えて発色反応を停止させ、490 nmの吸光度を測定した。この結果を図2に示した。図2より、間接競合ELISA法において、本発明のモノクローナル抗体Sn3J1-8-1は、塩化トリブチルスズを0.03 μg / ml から10 μg / ml の範囲で測定することができた。

#### 【0123】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Sn3J1-8-1に由来するモノクローナル抗体Sn3J1-8-1について、実施例7に記載した間接競合ELISA法と同様にして、7種類のトリブチルスズ化合物及び10種類の類縁化合物に対する反応性を検討した。

【0124】塩化トリブチルスズに対する反応性を100%として計算した結果を表3に示す。

【0125】

【表3】

26  
表3 モノクローナル抗体Sn3J1-8-1の交差反応性

化合物	分子式	分子量	交差反応性
			[mol%]
トリブチル・スズ・オキシド	$(\text{Bu}_3\text{Sn})_2\text{O}$	596.07	200
水素化トリブチルスズ	$\text{Bu}_3\text{SnH}$	291.06	100
フッ化トリブチルスズ	$\text{Bu}_3\text{SnF}$	309.05	100
塩化トリブチルスズ	$\text{Bu}_3\text{SnCl}$	325.51	100
臭化トリブチルスズ	$\text{Bu}_3\text{SnBr}$	369.95	100
ヨウ化トリブチルスズ	$\text{Bu}_3\text{SnI}$	416.94	100
酢酸トリブチルスズ	$\text{Bu}_3\text{SnOCOC}_2\text{H}_5$	349.10	100
塩化トリシクロヘキシルスズ	$(\text{c-Hex})_3\text{SnCl}$	403.61	64
塩化トリフェニルスズ	$\text{Ph}_3\text{SnCl}$	385.48	22
テトラブチルスズ	$\text{Bu}_4\text{Sn}$	347.17	<4
二塩化ジブチルスズ	$\text{Bu}_2\text{SnCl}_2$	303.84	<4
三塩化ブチルスズ	$\text{BuSnCl}_3$	282.17	<4
塩化トリプロピルスズ	$(\text{n-Pr})_3\text{SnCl}$	283.43	<4
塩化トリメチルスズ	$\text{Me}_3\text{SnCl}$	199.27	<4

【0126】表3より、本発明のモノクローナル抗体Sn3J1-8-1は、トリブチルスズ基と1対1で反応する。また、トリブチルスズ基に最も良く反応するが、トリシクロヘキシルスズ基、トリフェニルスズ基にも反応性を有する抗体であることが分かった。

【図面の簡単な説明】

\*【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ブチ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Sn3J1-8-1を用いた間接競合ELISA法による塩化トリブチルスズとの反応性を示す。

【図1】

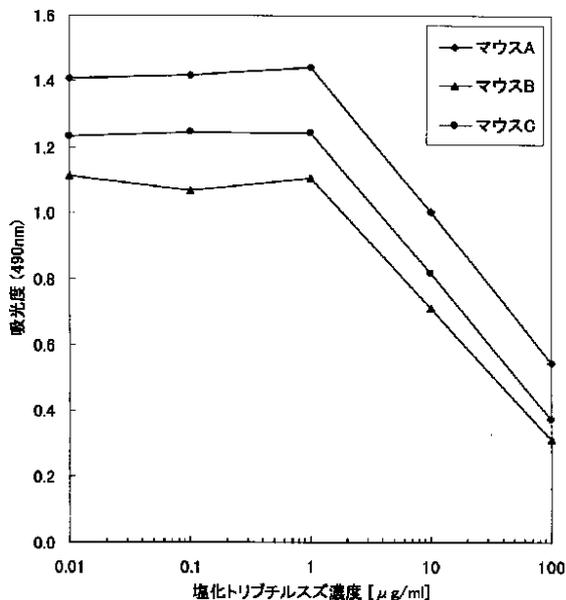


図1 抗血清による塩化トリブチルスズの測定

【図2】

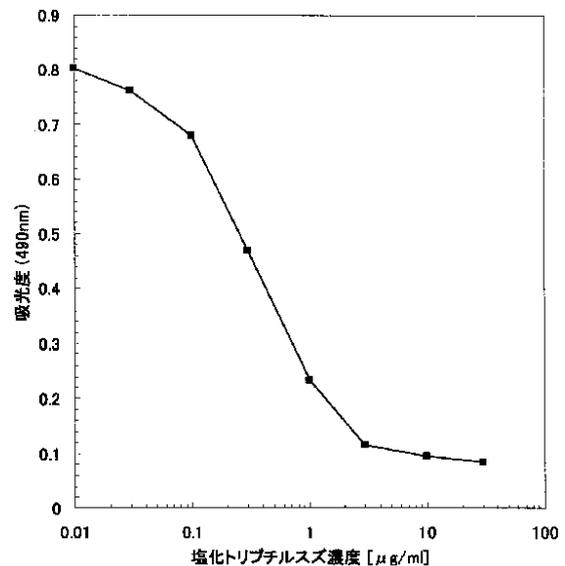


図2 間接競合ELISA法による塩化トリブチルスズの測定

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>  
// C 0 7 K 14/435  
14/76

識別記号

F I  
C 0 7 K 14/765  
C 1 2 R 1:91)

テマコード (参考)

14/765  
 (C 1 2 N 5/10  
 C 1 2 R 1:91)  
 (C 1 2 P 21/08  
 C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 P 21/08  
 C 1 2 R 1:91)  
 C 1 2 N 5/00  
 15/00  
 C 1 2 R 1:91)

B  
 C

(72)発明者 山崎 哲男  
 埼玉県幸手市権現堂1134 - 2 株式会社コ  
 スモ総合研究所研究開発センター内

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA17 BA43 DA02 GA05  
 HA15  
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13  
 DA16

(72)発明者 面田 内記  
 埼玉県幸手市権現堂1134 - 2 株式会社コ  
 スモ総合研究所研究開発センター内

4B065 AA92X AB05 BA08 CA25  
 CA46 CA54

(72)発明者 西川 誠司  
 埼玉県幸手市権現堂1134 - 2 株式会社コ  
 スモ総合研究所研究開発センター内

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA52  
 DA76 DA86 EA50 FA52

专利名称(译)	三丁基锡化合物的抗体和测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002128800A</a>	公开(公告)日	2002-05-09
申请号	JP2000318770	申请日	2000-10-19
[标]申请(专利权)人(译)	克斯莫石油株式会社 株式会社堀场制作所		
申请(专利权)人(译)	科斯莫石油有限公司 株式会社堀场制作所		
[标]发明人	宗像浩 山崎哲男 面田内記 西川誠司		
发明人	宗像 浩 山崎 哲男 面田 内記 西川 誠司		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/435 C07K14/76 C07K14/765 C07K16/44 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 C12R1/91		
FI分类号	C07K16/44 C12P21/08 G01N33/53.S C07K14/435 C07K14/76 C07K14/765 C12R1/91 C12N5/00.B C12N15/00.C C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA17 4B024/BA43 4B024/DA02 4B024/GA05 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B064/DA16 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4B065/CA54 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA52 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA52		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供三丁基锡化合物的抗体和测量方法。本发明的抗体通过使用三丁基锡化合物或三丁基锡衍生物作为半抗原而获得，所述三丁基锡化合物或三丁基锡衍生物具有其中间隔臂和用于结合的官能团共价结合至其一部分的结构。

