

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05583

研究課題名（和文）有機合成化学と抗体工学を基盤とする残留農薬検査キットの開発

研究課題名（英文）Development of pesticide residue test kit based on synthetic organic chemistry and antibody engineering

研究代表者

岩佐 精二（Iwasa, Seiji）

豊橋技術科学大学・工学（系）研究科（研究院）・シニア研究員

研究者番号：30303712

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、抗原抗体反応に基づく分子認識機構を利用した免疫的化学測定法（イムノアッセイ）による果物や農産物の残留農薬分析のための簡便、廉価、迅速、高精度、自在な測定環境などの特徴を有するイムノクロマトキットの作成を目的とし、実証試験まで行った。技術的には触媒的合成技術を用いて標的農薬分子にリンカーを導入し、巨大蛋白と結合させてマウス免疫することで標的的特異的なモノクロナール抗体を作成し、キット化した。実証段階では、キャベツの出荷前の簡易分析方として集荷場で実証試験を行った。その結果、イムノクロマトキットは簡便、廉価、迅速性と1次スクリーニングとしての十分な機能を有し、実用に耐えうる成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な環境負荷化学物質が健康や生態系に及ぼす影響が懸念されている。その手段として環境中の存在を常に監視するモニタリングが必要となる。ポジティブリスト制が施行され、全ての農薬の全ての作の残留基準値が設定されてから、作物への暴露や土壌残留による作物の汚染など想定していなかった農薬の残留の問題も表面化してきており、生産者の残留農薬への対応は必須となっている。環境及び食品の安全性を確保するには極微量の環境負荷化学物質を迅速・簡便かつ安価にしかも様々な場所で測定できる新しい技術開発が求められており、免疫化学測定法は有機溶剤などの多用による二次汚染のリスクが少なく有用な測定法として注目されている。

研究成果の概要（英文）：This research is characterized by simple, low-cost, rapid, high-precision, and flexible measurement environments for the analysis of pesticide residues in fruits and agricultural products by immunochemical assays (immunoassays) that utilize molecular recognition mechanisms based on antigen-antibody reactions. For the purpose of creating an immunochromatographic kit with Technically, a target-specific monoclonal antibody was created by introducing a linker into the target pesticide molecule using catalytic synthesis technology, binding it to a large protein, and immunizing mice, and made it into a kit. In the demonstration stage, a demonstration test was conducted at the collection point as a simple analytical method before shipment of cabbage. As a result, the immunochromatographic kit was simple, inexpensive, rapid, and had sufficient functions as a primary screening, and obtained practical results.

研究分野：有機合成化学

キーワード：触媒 抗体 残留農薬検査 有機合成化学 イムノアッセイ イムノクロマト キット ハプテン

1. 研究開始当初の背景

現在、様々な環境負荷化学物質が健康や生態系に及ぼす影響が懸念されている。これらの物質については、排出源を管理することが最も重要であるが、環境中の化学物質の濃度などについても自由度の高いモニタリングが重要となる。さらに、外国からの輸入冷凍食品に基準値以上の農薬が残留していた問題や、未登録農薬が販売されていた問題が明るみになって以来、消費者は食品の安全に強い関心を示すようになり、生産者も生産作物の残留農薬には細心の注意を払うようになった。また、2007年5月にポジティブリスト制が施行され、全ての農薬の全ての作物に対する残留基準値が設定されてから、農薬散布時の飛散による作物への暴露や土壌残留による作物の汚染などの報告もある。このような予期していなかった残留農薬の問題も表面化してきており、生産者の残留農薬への対応は必須となっている。

現在、これら低分子化合物の分析で主体となっている機器分析は、高額な機器、特定の設置場所、熟練技術等が必要で、しかも前処理に時間がかかる欠点がある。環境及び食品の安全性を確保するには極微量の環境負荷化学物質を迅速・簡便かつ安価にしかも様々な場所で測定できる新しい技術開発が求められており、とりわけ生物機能に基づく免疫化学測定法（イムノアッセイ）は有機溶剤などの多用による二次汚染のリスクが少なく有用な測定法として注目されている。

免疫化学測定法は、標的化合物に対して特異的な抗体を用いるが、農薬は低分子化合物であるため、それ自体を哺乳動物に直接免疫しても標的の抗体が得られない。一般的には、分子量1万以下の低分子化合物に対しては免疫応答を起こさないとされている。そこで標的物質にカルボキシル基などの官能基を有する側鎖を導入した誘導体（一般にハプテンという）を高分子蛋白質のアミノ基と結合させて免疫源とし、蛋白質の一部としてハプテンを認識させることにより、標的化合物を特異的に認識する抗体が得られる場合がある。しかしハプテンの構造は抗体の性能を大きく左右するためそのリンカーの導入位置、鎖長など合成は最重要工程である。このようにして得られる抗体は、低分子認識センサーとして残留農薬などの検査キットに応用できると考えられる。(図1)

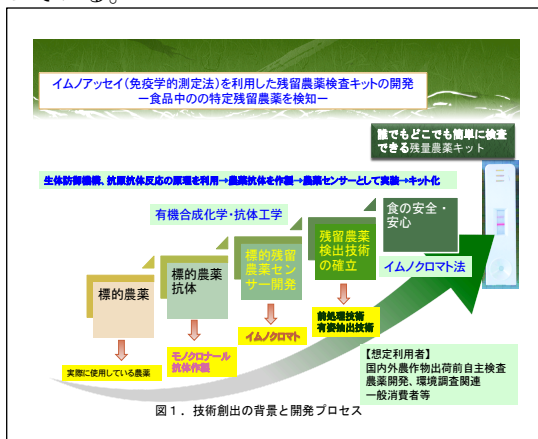


図1. 技術創出の背景と開発プロセス

2. 研究の目的

本研究は、抗原抗体反応に基づく分子認識機構を利用した免疫化学測定法（イムノアッセイ）による果物や農産物の残留農薬分析のための簡便、廉価、迅速、高精度、自在な測定環境などの特徴を有するイムノクロマトキットを提供することを目的とする。

3. 研究の方法

農薬はその多くが活性水素やハロゲンを含んでいることに特徴がある。これらの官能基性農薬の特徴に着目し、独自に開発した触媒を用いるリンカー導入方法（鈴木-宮浦反応、菌頭反応、カルベンの触媒的NHおよびOH挿入反応等）を応用してハプテン群の合成を行う。従って（1）水溶性農薬としてメタミドフォス類、リン酸エステル誘導体系抗菌剤系に標的を絞り様々な農薬群に触媒的手法によりカルボキシル基やリン酸エステル基を効率的に導入できる触媒を開発しリンカーを導入しハプテン群を合成する。（2）得られたハプテン群は暫時、巨大蛋白と結合させマウス免疫に提供し、モノクロナール抗体作成を行なう。（図2）ハプテン合成はELISA法による標的農薬の選択的定性・定量を達成するために、リンカー導入分子の設計が極めて重要である。実用に耐えうる感度（ppbレベル）の抗体が得られるまでハプテン合成の最適化を行う。

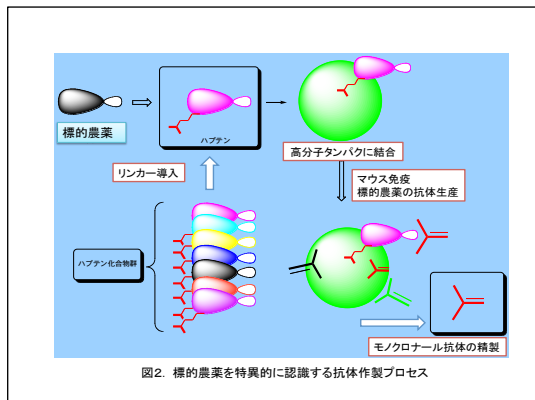


図2. 標的農薬を特異的に認識する抗体作製プロセス

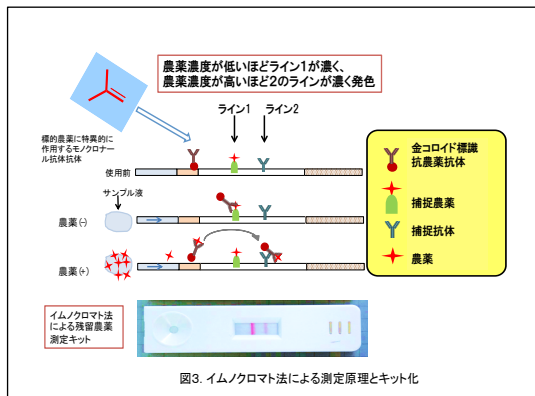


図3. イムノクロマト法による測定原理とキット化

感度の高い、抗体が得られると、これを用いて簡便、廉価、迅速、高精度、自在な測定環境などの特徴を有するキットを目指しイムノクロマトキットを完成させる。(図3)

上記のプロセスにより農薬ハプテン合成-タンパクとの融合-マウス免疫-抗体作成-残留農薬検査キット作成-実証試験を行う。

4. 研究成果

本研究は、免疫学的測定法(イムノアッセイ)を利用した超微量残留農薬分析法を確立し、簡便・廉価・迅速・高精度・自在な測定環境などを特徴とする残留農薬分析キットの社会実装を目指し実証試験を行うことを目的とした研究である。この研究を推進した結果、触媒設計の汎用化とその応用として標的とする低分子農薬の特異的な認識をする抗体の提供とクロマト原理を用いたイムノクロマトキットを完成させることができた。

触媒開発では、Ru-Pheoxの市販化を加速すると同時に、立体的反応場の空間制御のための様々な機能性を含む触媒として展開できた。また実証試験(使用キット:富士フィルム和光純薬(株)製造、Lot. TPN-1903(堀場製作所(株)より入手)、標的農薬:クロロタロニル(図4))では、キャベツの集荷場(農産物:キャベツ池田物産仕入れ元の農家生産、実施場所:池田物産(株)上り戸営業所)において管理者、作業者とともに実施した結果、最終的には、実用に耐えうる残留農薬検査キットであるとの意見が得られた。

具体的には、1)現状の外注による機器分析は出荷前に結果が出ない、コストが高いという難点がある。2)以前行ったスマートアッセイによる残留農薬試験より、前処理が格段に容易になっている。3)抽出時間が3分でできるのは作業手間の大幅な軽減と感ずる。4)スマートアッセイは実際に200検体の検査を実施した結果、導入は困難であったが、今回のキットであれば導入可。理由は、スマートアッセイの場合は1人で何サンプルも実施するのは困難であるが、本キットは前処理と測定が簡便であることにより、1人でも実施できる。5)1ウエルあたり1000円であり、それより安価であることは必須要件である。6)バイタミックス以外の粉砕機・破砕機を使用する場合の抽出時間等を示し、前処理の選択肢を増やしてほしい。7)0ppbで上のラインが出ないようにしてほしい。8)0と1ppbの差が読み取りにくい。9)改善できないのであれば、1ppbを色見本から除いてほしい。10)分析機器による外注は実際に出荷するロットの作物の検査はできないが、本キットによる検査を導入すれば、出荷前検査が可能となるので、意義は大きい。などの意見が寄せられた。

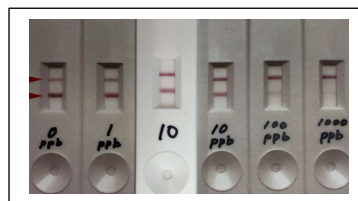
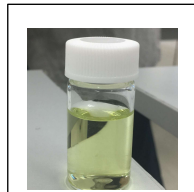
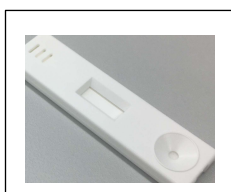


図4 製造した検査キット 図5 キャベツからの抽出液 図6 イムノクロマトキットの定量

また実施者からは、1)前処理、キットに関する作業は専門家でなくても容易にできそうであることが実証できたので、屋内で電源があり、継続的に検査を行うような環境においては、このまま適用できそうである。2)色見本との比較については、慣れるまで判定が難しそうに感じた。3)目の前にある農産物が直接分析され結果が明らかになるというプロセスは直接的かつ自己管理への信頼を実感できる(山本部長)とのコメントに代表されるように、今回の実証試験では、残留農薬キットの工業化および量産化に向けて大きな自信となった。検査における重要な要素である廉価、迅速、自在な測定環境などを特徴とする残留農薬検査キットは、今後、市場開拓や拡販努力により国内外のユーザーを獲得できる可能性があると感じた。

加えて、東南アジアでの実証試験や開発に着手した。具体的には、ベトナム国家大学ホーチミン市天然資源環境大学、サイゴン国際大学、ベトナム国家大学ホーチミン市工科大学、フエ医科薬科大学などと連携をとり情報収集を開始した。2022年度ではサイゴン国際大学で新しい学科を創設する動きがあり、天然物の抽出や環境モニタリング、果物や野菜の残留農薬検査キットの実証を目指して連携していくことに合意した。また2023年にはベトナム国家大学ホーチミン市天然資源環境大学、ベトナム国家大学ホーチミン市工科大学、フエ医科薬科大学と同様に連携を強化していくことに合意した。

近年の農林水産省の方針で「みどりの食料システム戦略」において、みどりの食料システム法が成立し本格的に稼働していく現況にある。中でも目標が設定され2030年には農薬が10%削減、2050年には50%削減を目指している。このような背景から残留農薬検査、環境負荷化学物質、合成化学薬品などの廉価、簡便、迅速、自在な測定などがより強く求められていくものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 岩佐精二	4. 巻 87
2. 論文標題 残留農薬検査キットの開発 - 異分野先端技術の連携と融合 -	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 バイオテック東海	6. 最初と最後の頁 64-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nansalmaa Otog , Bilguun Gantogos , Ikuhide Fujisawa , Seiji Iwasa	4. 巻 58
2. 論文標題 Highly enantioselective synthesis of norcaradiene derivatives from naphthyl diazoacetamides using a Ru(η^5 -Pheox) complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 12325-12328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2cc04355f	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Amandine Pons , Jonathan Decaens , Riham Najjar , Nansalmaa Otog , Mathieu Arribat , Sandrine Jolly , Samuel Couve-Bonnaire , Muriel Sebban , Gael Coadou , Hassan Oulyadi , David Speybrouck , Seiji Iwasa , Andre B. Charette , Thomas Poisson , Philippe Jubault	4. 巻 7
2. 論文標題 Fluorocyclopropane-Containing Proline Analogue: Synthesis and Conformation of an Item in the Peptide Chemists Toolbox	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 4868-4878
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.1c0533	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nansalmaa Otog , Bilguun Gantogos , Ikuhide Fujisawa , Seiji Iwasa	4. 巻 58
2. 論文標題 Highly enantioselective synthesis of norcaradiene derivatives from naphthyl diazoacetamides using a Ru(η^5 -Pheox) complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 12325-12328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2cc04355f	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 岩佐精二	4. 巻 2022
2. 論文標題 残留農薬検査キットの開発 – 異分野先端技術の連携と融合 –	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 バイオテック東海	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Otog, N., Chanthamath, S.; Fujisawa, I.; Iwasa, S.	4. 巻 2021
2. 論文標題 Catalytic Asymmetric Carbene Insertion Reactions into B-H Bonds Using a Ru(II)-Pheox Complex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Euro Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 1564-1567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ejoc.202100034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Inoue, H.; Doan, T. T. T.; Batgerel, Z.; Langendorf, M, N.; Fujisawa, I.; Iwasa, S.	4. 巻 13
2. 論文標題 Ru(II) Pheox Catalyzed Highly Stereoselective Cyclopropanation of Allyl and Vinylsilanes with Diazoesters and Their Synthetic Applications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemCatChem,	6. 最初と最後の頁 328-337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cctc.202001427	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Eiki Watanabe; Yuki Hirakawa; Tomomi Yamasaki; Seiji Iwasa; Shiro Miyake, Eiki Watanabe	4. 巻 52
2. 論文標題 Immunoassay for Highly Water-soluble Nitenpyram: Evaluating the Analytical Performance of an Easy-to-use Screening Method for Agricultural Samples	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Letters	6. 最初と最後の頁 174-187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00032719.2019.1642343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nga Phan Thi Thanh、Tone Masaya、Inoue Hayato、Shibatomi Kazutaka、Iwasa Seiji	4. 巻 840
2. 論文標題 Highly Efficient Synthesis of Oxindole Derivatives Via Catalytic Intramolecular C-H Insertion Reactions of Diazoamides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Key Engineering Materials	6. 最初と最後の頁 251 ~ 256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4028/www.scientific.net/KEM.840.251	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 MIYAKE Shiro、HIRAKAWA Yuki、YAMASAKI Tomomi、WATANABE Eiki、HARADA Ayako、IWASA Seiji、NARITA Hiroshi	4. 巻 36
2. 論文標題 Simultaneous Detection of Six Different Types of Pesticides by an Immunosensor Based on Surface Plasmon Resonance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 335 ~ 340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.19P333	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayato Inoue、Nga Phan Thi Thanh、Ikuhide Fujisaw、Seiji Iwasa	4. 巻 22
2. 論文標題 ynthesis of Forms of a Chiral Ruthenium Complex Containing a Ru - Colefin(sp ²) Bond and Their Application to Catalytic Asymmetric Cyclopropanation Reactions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 1475-1479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.0c00050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Takuji、Thu Huong Dang Thi、Iwasa Seiji	4. 巻 61
2. 論文標題 Synthesis of β -lactams via Ru(II)-Pheox-catalyzed regioselective intramolecular Csp ³ H insertion of diazoacetamides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 152276 ~ 152276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2020.152276	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Phan Thi Thanh Nga, Dang Thi Thu Huong, Tone Masaya, Inoue Hayato, Iwasa Seiji	4. 巻 76
2. 論文標題 Synthesis of Oxindole Derivatives via Intramolecular C-H Insertion of Diazoamides Using Ru(II)-Pheox Catalyst	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 131481 ~ 131481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tet.2020.131481	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 藤井 琢真, Dang Thi Thu Huong, 岩佐 精二
2. 発表標題 ジアゾアミドの分子内C(sp ³)-H挿入反応を経由する縮環型 -ラクタム類の効率的な合成法の開発
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nansalma Otog, Linh Da Ho, Iwasa, S.,
2. 発表標題 Catalytic Asymmetric Cyclopropanation Reactions of Diazo Oxime Ethers with Olefins and Their Synthetic Applications
3. 学会等名 PacifiChem2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小椋健司・岩佐精二
2. 発表標題 アリルホウ素化合物への触媒的不斉シクロプロパン化反応
3. 学会等名 中化連第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 OTOG NANSALMAA・井上颯斗・BATGEREL ZOLZAYA・岩佐精二
2. 発表標題 アリル-及びビニルシラン類の触媒的不斉シクロプロパン化反応とその応用
3. 学会等名 中化連第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 GANTOGOS Bilguun・OTOG Nansalmaa・岩佐精二
2. 発表標題 芳香環への触媒的不斉カルベン移動反応の開発
3. 学会等名 中化連第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 BATGEREL ZOLZAYA・OTOG NANSALMAA・岩佐精二
2. 発表標題 オレフィン類とジアゾオキシム化合物の触媒的不斉カルベン移動反応の開発
3. 学会等名 中化連第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nengchue Oudomphone・山口剛・岩佐精二
2. 発表標題 Z-アルケニルジアゾカルボニル化合物の触媒的分子内不斉シクロプロパン化反応の開発
3. 学会等名 中化連第52回秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井 琢真, Dang Thi Thu Huong, 岩佐 精二
2. 発表標題 ジアゾアミドの分子内C(sp ³)-H挿入反応を経由する縮環型 -ラクタム類の効率的な合成法の開発
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松永安由、西野友美、杉田和俊、三添英朗、横川武弘、 足立香代、岩佐精二、坂真智子、三宅司郎
2. 発表標題 イムノクロマト技術を用いたトマト中に残留する殺菌剤アゾキシストロピンの検出
3. 学会等名 第43回農薬残留分析研究会、日本農薬学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------