

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550179

研究課題名(和文)免疫化学測定法による低分子残留農薬の分析

研究課題名(英文)Residue analysis of low molecular weight insecticides with immunoassay

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)・教授

研究者番号：30303712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：残留農薬分析技術の確立は、環境負荷低減と野菜などの生鮮食品の安全性確保の観点から重要な課題である。本研究は、免疫的化学測定法(イムノアッセイ)を利用した簡便廉価、迅速、高精度、移動性などの特徴を有する低分子残留農薬分析法の確立を目的として研究を行った。その結果、標的農薬ハプテン合成を経て標的農薬特異的なモノクロナール抗体の作成に成功し、アゾキシストロピンやクロロタロニルなどの農薬に対する免疫化学測定法を確立するとともに市販に至った。確立した技術は迅速で簡便・廉価な点で有用であり、微量で特異的に標的物質の定性や定量が可能である。また移動性が高く機器分析に比べて利点がある。

研究成果の概要(英文)：To develop a residue analysis of low molecular agricultural chemicals is one of most important subjects as for both human health and environmental consideration. For this regard, our objective of this research project is to develop a simple analytical method with immunoassay being comparable to conventional instrumental analysis. During this research project, we established residue analysis of fungicides, azoxystrobin and chlorothalonil with immunoassay in the range from ppm to ppb. This system is simple, rapid, cost-effective, high mobility and high throughput analytical method and now commercially available.

研究分野：複合化学

科研費の分科・細目：環境分析

キーワード：残留農薬 リスト制 モノクロナール抗体 ハプテン 有機合成 触媒反応 ELISA イムノアッセイ ポジティブ

1. 研究開始当初の背景

(1) 免疫的化学測定法の現状と残留農薬分析

抗原抗体反応を利用した免疫的化学測定法は、ELISA法として知られ、医療や生命科学の分野で、特に特定タンパク質等の高分子量物質を標的としてその定性分析に利用されている。機器分析が高価で時に煩雑な前処理や熟練技能を要するのに比べて、免疫的化学測定法は、迅速で簡便・廉価な点に於いて注目を集めており、これらの利点を活かして、現在、BSE(牛海綿脳症)全頭検査における一次スクリーニングにも利用されている。さらに医学・薬学の分野では、血液中や尿中の標的物質の定性・定量などに広く応用されている。一方、この免疫化学測定法を用いる残留農薬測定はわずかであり、現在登録認定されている約700種の95%以上の農薬についてその迅速・分析法が存在しない。加えて日々新規農薬登録が行われている。

(2) 残留農薬の分析とその問題点

湿度が高い日本では、野菜や果物などの生鮮食品への農薬の使用は、不可欠であり高い生産性と形態的品質を保ち、需要を満足させてきた。このような農薬は殺虫剤や殺菌剤に代表される毒性の強い生理活性を示す低分子有機化合物(分子量1000以下)がほとんどである。しかし残留農薬の微量分析は容易ではない。一般的に、煩雑な前処理の後に、液体クロマトグラフや質量分析、あるいはそれらの連動した複合的、総合的分析機器類などの高価な分析装置に頼ると同時に分析場所も限られ、自在な分析方法とはほど遠く、総じて長時間の分析期間が必要であることがほとんどである。このような状況は、必然的に健康被害や社会的問題として表面化した後に対応が図られる場合がほとんどである。加えて農薬のポジティブリスト制への政策的移行により、残留農薬の迅速な分析法の開発が求められている。

(3) 免疫的化学測定法を用いる利点

免疫的化学測定法は原理的に生物機能としての抗原抗体反応を利用する。ゆえに微量で特異的に標的物質の定性や定量が可能である。さらに分析に場所を選ばないで測定を行うこ

とができる点、すなわち廉価、迅速、自在な分析環境を提供しうる点において既存の総合的機器分析システムに比べて大きな利点がある。また使用有機溶媒も劇的に減少することができる。

(4) 免疫的化学測定法を用いる問題点

免疫的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抗体が得られない。一般に分子量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。

2. 研究の目的

本研究は、免疫的化学測定法(イムノアッセイ)を利用した簡便、廉価、迅速、高精度、自在な測定環境などの特徴を有する低分子残留農薬分析法の確立を目的とする。すなわち低分子農薬に触媒的手法を用いてリンカーを導入し、巨大蛋白と結合させてマウス免疫することで分子センサーとしての標的農薬特異的なモノクローナル抗体を作成する。得られる抗体の分析精度を ppm~ppb レベルを目標として低分子残留農薬分析法を確立する。本研究で確立される技術は高価な機器分析に比べて多くの利点を有し、環境監視や健康の維持に大きく貢献する。

3. 研究の方法

研究は2段階で進行する。即ち、第一段階は精密有機合成化学を基盤としたハプテン群の全合成であり、第二段階は抗体作成である。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(ppm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

と同時に、適切な抗体が得られたときはと直ちにキット化し実用化する。抗体が標的農薬の分子構造を特異的に認識し、定性されるように標的農薬リンカーを導入し、ハプテン群を触媒的炭素-炭素結合生成反応を利用して合成する。触媒系の基礎は既に開発し、報告済みである。即ち、オキサゾリニルフェニルパラジウム (Phebox- or Pheox-Pd) がハロゲン化アリールとアリールボロン酸との反応において触媒作用し効率的にアリール/アリーカップリング生成物が生成する。(鈴木-宮浦反応) この触媒を用い、ヘック-溝呂木反応や菌頭反応に応用が可能であることを見出し、触媒効率も同様のレベルであることを確認した。従って Phebox- or Pheox-Pd 触媒によって様々なアリールハロゲン構造を有する殺菌剤、殺虫剤などのアクリル系カルボン酸リンカーを導入できると考えている。さらに、触媒的炭素-炭素結合生成反応においてジアゾエステル類の触媒的カルベントランスファー反応においても優れたルテニウム系触媒を見出している。二重結合や活性水素を室温で高効率で進行し相当するシクロプロパン化合物や、炭素-ヘテロ原子結合を含む生成物を与える。このルテニウム触媒は Phebox-Ru であり、リンカー導入が可能であることから、ハプテン群合成に応用できると考えている。したがって具体的には以下のように研究を進行する予定である。

(1) 触媒合成は報告した方法によってビス(オキサゾリニル)フェニルパラジウム (Phebox-Pd) およびオキサゾリニルフェニルルテニウム (Phebox- or Pheox-Ru) を合成し、触媒活性を同時に検討するためカウンターアニオンを変化させた系 (BF_4^- , PF_6^- , OAc 等) や配位子の芳香族環上置換基を電子供与基や電子吸引基を芳香族環に有する系を併せて合成する。さらに Phebox-Ru 系触媒では芳香族環にカルボニル基やヘテロ原子が直結した農薬系でハロゲンを利用することなく直接的にオルトメタレーションを経由してカルボニル基末端を有する側鎖を導入する検討を行う。加えて新規有機金属化合物は NMR や X 線構造解析によってその錯体構造を精査する。上記で得られた Phebox- or

Pheox-Pd 系および Phebox- or Pheox-Ru 触媒、さらに最近開発に成功した新規合成法を含むマクロ多孔性架橋重合体触媒 P1 (筆者等、*Angew. Chem Int Ed.* 2010) を用いて殺菌剤農薬とのヘック-溝呂木反応やカルベン挿入反応などによりハプテン群を合成する。カルベンヘック-溝呂木反応の場合は、触媒は Phebox-Pd 触媒以外にも古典的な既知パラジウム系を同時に精査し効率のよい系を見出す。

(3) 一般に、哺乳動物は分子量 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。そこで標的低分子農薬である有機化合物をアルブミンやスカシ貝 KHL 等の担体蛋白質に共有結合させて高分子標的に変換し、これを免疫源とする。暫時得られたハプテン群は堀場製作所(株)に依頼しマウス免疫により抗体作成を行なう。初期段階で得られる抗体はマルチクロナール抗体で感度が低いため、標的抗体のみを単離し細胞融合により増殖させモノクロナール抗体を単離精製する。

(4) 得られた抗体はモノクロナール抗体として ELISA 法にセットアップする。即ち図に示したような原理に基づき直接 ELISA 法による標的農薬の分子センサーとして免疫測定法が完成する。

4. 研究成果

(1) 抗体作成のための標的農薬のハプテン群合成において炭素-炭素および炭素-窒素結合形成や二重結合への立体選択的挿入反応(触媒的不斉シクロプロパン化反応)などを効率的に行う触媒開発に成功した。開発した触媒を利用してリン酸エステル系農薬のハプテン合成に有用なプロセスを開発した。(論文 2-9)

(2) 標的農薬のハプテン群を 10 種類と新規抗体作成用(アゾキシストロピン、ボスカリド、クロロタロニルなど)を合成して目的の標的農薬特異的な抗体作成に成功した。(論文 1、10)

(3) アゾキシストロピンとクロロタロニルの残留農薬キットの作成、販売に至った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

1. Okazaki, F.; Hirakawa, Y.; Yamaguchi (Murakami), Y.; Harada, A.; Watanabe, E.; Iwasa, S.; Narita, H.; Miyake, S. "Development of Direct Competitive ELISA for Residue Analysis of Fungicide Chlorothalonil in Vegetables", *Food Hygiene and Safety Science*, **55**, [65-72], (2014).
2. Chanthamath, S.; Ozaki, S.; Shibatomi, K.; Iwasa, S. "Highly Stereoselective Synthesis of Cyclopropylphosphonates Catalyzed by Chiral Ru(II)-Pheox Complex" *Organic Letters*, **16**, [3012-3015], (2014). DOI: 10.1021/ol501135p.
3. Chanthamath, S.; Chua, H. W.; Kimura, S.; Shibatomi, K.; Iwasa, S. "Highly Regio- and Stereoselective Synthesis of Alkylidenecyclopropanes via Ru(II)-Pheox Catalyzed Asymmetric Inter- and Intramolecular Cyclopropanation of Allenes" *Organic Letters*, **16**, (2014). in press.
4. Abu-Elfotouh, A. -M.; Tsuzuki, K.; Nguyen, B. T.; Chanthamath, S.; Shibatomi, K.; Iwasa, S. "Quinones Synthesis via Hydrogen Peroxide Oxidation of Dihydroxy Arenes Catalyzed by Homogeneous and Macroporous-Polymer-Supported Ruthenium Catalysts", *Tetrahedron*, **69**, [8612-6817], (2013).
5. Chanthamath, S.; Takaki, S.; Shibatomi, K.; Iwasa, S. "Highly Stereoselective Cyclopropanation of α , β -Unsaturated Carbonyl Compounds with Methyl (diazoacetoxy)acetate Catalyzed by Chiral Ru(II)-Pheox Complex", *Angewandte Chemie International Editions*, **52**, [5930-5933], (2013).
6. Chanthamath, S.; Nguyen, D.; Shibatomi, K.; Iwasa, S. "Highly Enantioselective Synthesis of Cyclopropylamine Derivatives via Ru(II)-Pheox Catalyzed Direct Asymmetric Cyclopropanation of Vinylcarbamates", *Organic Letters*, **15**, [772-775], (2013).
7. Abu-Elfotouh, A.-M.; Thi Nguyen, D. P.; Chanthamath, S.; Phomkeona, K.; Shibatomi, K.; Iwasa, S. "Water-Soluble Chiral Ruthenium(II) Phenyloxazoline Complex: Reusable and Highly Enantioselective Catalyst for Intramolecular Cyclopropanation Reactions", *Advanced Synthesis & Catalysis*, **354**, [3435-3439], (2012).
8. Chanthamath, S.; Thongjareun, S.; Shibatomi, K.; Iwasa, S. "Ru(II)-Pheox Catalyzed N-H Insertion Reaction of Diazoacetamides: Synthesis of N-Substituted α -Aminoamides", *Tetrahedron Letters*, **53**, [4862-4865], (2012).
9. Chanthamath, S.; Phomkeona, K.; Shibatomi, K.; Iwasa, S. "Highly Stereoselective Ru(II)-Pheox Catalyzed Asymmetric Cyclopropanation of Terminal Olefins with Succinimidyl Diazoacetate", *Chemical Communications*, **48**, [7750-7752], (2012).
10. Kondo, M.; Tsuzuki, K.; Hamada, H.; Yamaguchi (Murakami), Y.; Uchigashima, M.; Saka, M.; Iwasa, S.; Narita, H.; Miyake, S. "Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Residue Analysis of the Fungicide Azoxystrobin in Garden Crops", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**, [904-911], (2012).

国際会議

1. S. Chanthamath, S. Ozaki, K. Shibatomi and S. Iwasa, "Ru(II)-Pheox Catalyzed Asymmetric Cyclopropanation of Diethyl Diazomethylphosphonate with Various Alkenes" International Conference of Organometallic Chemistry, 2014, 7, Sapporo, Japan.
2. S. Chanthamath, S. Kimura, K. Shibatomi, S. Iwasa, "Highly Enantioselective Synthesis of Alkylidenecyclopropanes via Ru(II)-Pheox Catalyzed Asymmetric Cyclopropanation of Allenes with Succinimidyl Diazoacetate", 12th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-12), November 12-16 (Kyoto), Abstract p193 (PC-022) (2012).

国内学会

1. 尾崎星也, Chanthamath Soda, 柴富一孝, 岩佐精二, "ジエチルジアゾメチル

ホスホネートのアルケン類への触媒的不斉シクロプロパン化反応", 第44回中部化学関係学協会支部連合秋季大会(浜松), 2A12 (2013).

2. Chua Hao Wei, Chanthamath Soda, 柴富一孝, 岩佐精二, "フェニルオキサゾリン-Ru(II)触媒を用いる新規アレンジアゾアセテートの不斉分子内シクロプロパン化反応", 第44回中部化学関係学協会支部連合秋季大会(浜松), 2P61 (2013).
3. Chanthamath Soda, 尾崎星也, 柴富一孝, 岩佐精二, "Ru(II)-Pheox 触媒による高立体選択的シクロプロピルホスホネート類の合成", 第60回有機金属化学討論会(東京), P1A-15 (2013).
4. Chanthamath Soda, 柴富一孝, 岩佐精二, "Ru(II)-Pheox 触媒によるメチル(ジアゾセトキシ)アセテートの α,β -不飽和カルボニル化合物への不斉シクロプロパン化反応", 日本化学会第92春期年会(横浜), 1PB037 (2012).
5. Chua Hao Wei, Chanthamath Soda, 柴富一孝, 岩佐精二, "フェニルオキサゾリン-Ru(II)触媒を用いる新規アセトニルジアゾアセテートの高速及び高立体選択的シクロプロパン化反応" 第42回中部化学関係学協会支部連合秋季大会, Abst. pp.99-99, 1P30, Nov.6-7, 2011, 長野.

〔雑誌論文〕(計 10 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
岩佐 精二 (IWASA SEIJI)

研究者番号：30303712

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：