

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26288087

研究課題名(和文) 精密有機化学と抗体工学を駆使した環境負荷物質のイムノアッセイ技術の確立

研究課題名(英文) Development of Immunoassay Technology with Fine 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)・教授

研究者番号：30303712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：食の安心・安全の確保と信頼しうる食の提供のため免疫的化学測定法を利用した低分子残留農薬分析法を確立した。付随して新規ルテニウム触媒の開発にも成功し様々なカルベン移動反応に展開できた。現在用いられている農薬の簡便、廉価、迅速、高精度、自在な測定環境などの特徴を有する分子センサーをELISA法やイムノクロマトキット化に寄与することができた。すなわち低分子農薬に触媒的精密合成技術を用いてリンカーを導入し、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ナール抗体を作成した。得られた抗体の分析精度をppbレベルの分析精度を持つ低分子残留農薬分析法を確立した。

研究成果の概要(英文)：To keep food safety and the reliance, the development of a residue analysis of low molecular agricultural chemicals is one of most important social requirements as for both human health and environmental consideration. For this regard, our objective of this research project is to develop a simple, rapid and low cost performance analytical method with immunoassay being comparable to conventional instrumental analysis such as HPLC, GC, MASS and their combination. During this research project, we have established pesticide residue analysis with immunoassay method in the range of ppb. The key technology of immunoassay is the preparation of highly selective antibody to recognize the target pesticide residue. The catalyst was newly developed to introduce suitable linker on the pesticide and also apply carbentranfer reaction of diazo-comopunds. This system is simple, rapid, cost-effective, high mobility and high throughput analytical method and now commercially available.

研究分野：有機合成化学

キーワード：残留農薬分析 環境分析 抗原抗体反応 イムノアッセイ法 ELISA法 触媒 カルベン イムノクロマト法

1. 研究開始当初の背景

(1) 残留農薬の分析とその問題点について

食の安心・安全の確保と信頼しうる食の提供は、私たちの日々の生活の基盤であり、不可避の課題である。食料として一般的に野菜や果物などの農産物への農薬の使用は、高い生産性を維持消費者の需要を満足させるために重要な技術である。このような農薬は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、一般的に、高価な分析装置に依存している。しかし煩雑な前処理の後に、液体クロマトグラフや質量分析、あるいはそれらの複合的な分析機器を用い、同時に分析場所も限られ、だれでもどこでも分析できるという方法とはほど遠い。また総じて長時間の分析時間が必要である。結果的に、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。

(2) 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、イムノアッセイ法としてすでに確立された原理として知られ、医療や生命科学の分野で、特に高分子量の特定タンパク質を標的としてその定性分析に利用されている。(医学・薬学の分野では、血液中や尿中の標的物質の定性・定量や狂牛病の1次スクリーニングなどなどに広く応用されている。) 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・廉価な点と機器分析とを相補的に利用する事でより迅速で正確な分析結果の提供が可能である。一方、この免疫化学測定法を用いる残留農薬測定は少なく、現在登録認定されている約700種の9.5%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。現在、実質的に用いられている農薬は40種程度である。

(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。さらに多くの場合、分析センターや研究所等の分析場所を限定し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農薬に対して特異的

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ことがほとんどである。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さないとされている。そこで標的物質に水酸基やカルボキシル基などの官能基を有する側鎖を有機合成が学的に導入した誘導体(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、得られた蛋白質の一部として農薬の分子構造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、鎖長などハプテン合成は最重要工程である。

2. 研究の目的

本研究は、食の安心・安全の確保と信頼しうる食の提供のために精密有機合成化学と分子生物学、抗体工学との先端融合技術を用いることより免疫的化学測定法を利用した低分子残留農薬分析法を確立し、実質的に現在用いられているすべての農薬の簡便、廉価、迅速、高精度、自在な測定環境などの特徴を有する分子センサーを提供することを目的とする。すなわち低分子農薬に触媒の精密合成技術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ppbレベルの分析精度を目標として環境負荷物質としての低分子残留農薬分析法の確立をする。

3. 研究の方法

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、炭素-酸素、炭素-窒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- あるいは 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においてさえも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、ジアゾエステルを用いる事で酢酸ユニット (-CH₂COOH) をリンカーとして導入が可能である。具体的には以下のように研究を進行した。

(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(Pheox-Ru)を合成し、触媒活性を同時に検討するため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した。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。

2) 上記で得られる Phebox- または Pheox-Pd 系および Phebox- または 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グ群を随時、合成した。

(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ン貝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グ群は堀場製作所(株)に依頼しマウス免疫により抗体作成を行なった。抗体は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ーナル抗体を単離精製して野役交代として用いた。

(4) 得られた抗体はモノクローナル抗体として ELISA 法にセットアップする。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を完成した。(担当: 岩佐、堀場製作所(株)平成 27 年 10 月-平成 28 年 3 月) 成果は、国内外学会発表、論文発表、特許申請等を行った。

(5) 上記(1)-(4)のプロセスにより農薬ハプテング合成-タンパクとの融合-マウス免疫-抗体作成-農薬分子センサー化および工業化を行った。一方、これまで環境負荷物質に対して精密有機合成技術でリンカーの導入を検討しているが、逆に高分子量の担持用タンパクにリンカーの導入を検討した。すなわち、タンパクの部分構造であるアミノ基やカルボキシル残基にリンカーを導入し(主に縮合反応を用いる) 続いて標的農薬官能基群とのカップリングを試みた。この発想は新規であり報告例はない。実際には構造

決定が難しく明確な知見は得られていない。しかし農薬ハプテング分子の全合成や合成的修飾よりも実験的に遥かに簡便で、免疫用のタンパクとの標的農薬ハプテングとの融合体が容易に提供できるため迅速に抗体作成が完成する可能性があるため今後の課題として研究を継続・精査する。

6) 抗体作成に付随して標識農薬ハプテングが必要でありこれらを合成する。標的はイソキサチオン誘導体の合成、イマザリル誘導体、トリフルミゾール誘導体、フェニトロチオン誘導体、マラチオン誘導体、クロロタロニル誘導体、ボスカリド誘導体、フィプロニル誘導体などの農薬ハプテング合成を行った。これら一群の農薬は近年、分析依頼の頻度、重要性ともに最も社会的要求度の高い農薬である。なお予備合成実験は終了しており合成の最適化を行った。誘導体合成は 20 化合物の合成を行った。現在、最も重要な 23 種の標的農薬に対応する特異的な抗体が完成しており、実質的に現在使用されている他の 20 種類の抗体の作成が完成すればすべての国内市販農薬の簡易分析が完成する。

4. 研究成果

本研究では、食の安心・安全の確保と信頼しうる食の提供のため精密有機合成化学と抗体工学との先端融合技術を用いることより免疫的測定法(イムノアッセイ)を利用した低分子残留農薬分析法を確立した。付随して新規ルテニウム触媒の開発にも成功し様々なカルベン移動反応に展開した。実質的に現在用いられている農薬の簡便、廉価、迅速、高精度、自在な測定環境などの特徴を有する分子センサーを ELISA 法やイムノクロマトキット化に寄与することができた。すなわち低分子農薬に触媒の精密合成技術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 ppb レベルの分析精度を目標として環境負荷物質としての低分子残留農薬分析法を確立した。

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)

[雑誌論文](計 10 件)

1. Nakagawa, Y.; Chanthamath, S.; Shibatomi, K.; Iwasa, S. "Ru(II)-Pheox-Catalyzed Si-H Insertion Reaction: Construction of Enantioenriched Carbon and Silicon Centers" *Chemical Communications*, 53, [3753-3756] (2017).

2. Hamada, M., M.; Chanthamath, S.; Shibatomi, K.; Iwasa, S. "Inter- and Intramolecular Cyclopropanations of Diazo Weinreb Amides Catalyzed by Ruthenium(II)-*Amm*-Pheox" *Advanced Synthesis & Catalysis*, *359*, [1-6], (2017).
 3. Chanthamath, S.; Iwasa, S. "Enantioselective Cyclopropanation of a Wide Variety of Olefins Catalyzed by Ru(II)-Pheox Complexes" *Account of Chemical Research*, *46*, [2080-2090], (2016).
 4. Soda Chanthamath, Hamada S. A. Mandour, Tong Thi Minh Thu, Kazutaka Shibatomi and Seiji Iwasa "Highly Stereoselective Cyclopropanation of Diazo Weinreb amides Catalyzed by Chiral Ru(II)-*Amm*-Pheox Complexes" *Chemical Communication*, *52*, [7814-7817], (2016).
 5. Hirakawa, Y., Yamasaki, T.; Watanabe, E.; Okazaki, F.; Murakami-Y., Y.; Oda, M.; Iwasa, S.; Narita, H.; Miyake, S., "Development of an Immunosensor for Determination of the Fungicide Chlorothalonil in Vegetables, using Surface Plasmon Resonance" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*, 28, [6325-6330], (2015).
 6. Hirakawa, Y.; Yamasaki, T.; Harada, A.; Ohtake, T.; Adachi, K.; Iwasa, S.; Narita, H.; Miyake, S. "Analysis of the Fungicide Boscalid in Horticultural Crops Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and an Immunosensor Based on Surface Plasmon Resonance" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*, [8075-8082], (2015).
 7. Nakagawa, Y.; Chanthamath, S.; Shibatomi, K.; Iwasa, S. "Highly Stereoselective Intramolecular Cyclopropanation Reactions of α,β -Unsaturated Esters Catalyzed by Chiral Ru(II)-Pheox Complex and their Application for the Synthesis of Medicinal Compounds" *Organic Letters*, *17*, [2792-2795], (2015).
 8. 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).
 9. 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).
 10. 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*, [3408-3411], (2014).
- [学会発表](計 18 件)
1. Yoko Nakagawa, Soda Chanthamth, Kazutaka Shibatomi, Seiji Iwasa "Catalytic Functionalization of Disubstituted Silane by Si-H Insertion Reaction using Ru(II)-Pheox Complex" *2017 APCLSE The 4th Asia-Pacific Conference on Life Science and Engineering* June 20-22, 2017 Hanoi, Vietnam
 2. Soda Chanthamath, Kazutaka Shibatomi, Seiji Iwasa "Highly Stereoselective Inter- and Intramolecular Cyclopropanations of Diazoacetates Catalyzed by Ru(II)-*Amm*-Pheox Complex" *2017 APCLSE The 4th Asia-Pacific Conference on Life Science and Engineering* June 20-22, 2017 Hanoi, Vietnam
 3. Yoko Nakagawa, Soda Chanthamth, Kazutaka Shibatomi, Seiji Iwasa "Catalytic Asymmetric Si-H Insertion Reaction to Construct Enantioenriched Carbon and Silicon Centers by Ru(II)-Pheox" *25th International Symposium Synthesis in Organic Chemistry* London, UK.
 4. Y. Nakagawa, S. Chanthamath, K. Shibatomi and S. Iwasa, "Ru(II)-Pheox catalyzed enantioselective Si-H insertion reaction of diazoacetates", *252nd ACS National Meeting & Exposition*, Org-92, 2516748, Aug. 21st. 2016, Philadelphia, USA. Oral

5. Nakayama, N.; Nakagawa, Y.; Gotoh, H.; Iwasa, S. "Development of extended force field for Ru-carbene complex and conformational energy profiles of Ru=C rotation" *251st ACS National Meeting & Exposition*, San Diego, CA, USA, March 13-17, COMP-258, 2016.
6. Doan, T. T. T.; Chanthamath, S.; Nakagawa, Y.; Nakayama, N.; Goto, H.; Shibatomi, K.; Iwasa, S. *13th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-13)*, Nov., 9-13th, 2015, Kyoto, Japan.
7. Nakagawa, Y.; Chanthamath, S.; Nakayama, N.; Goto, H.; Shibatomi, K.; Iwasa, S. *13th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-13)*, Nov., 9-13th, 2015, Kyoto, Japan.
8. Nakagawa, Y.; Chanthamath, S.; Nakayama, N.; Goto, H.; Shibatomi, K.; Iwasa, S. "Computational Chemical Analysis for Ru(II)-Pheox Catalyzed Enantioselective Intramolecular Cyclopropanation" *250th ACS National Meeting & Exposition, American Chemical Society*, Boston, MA, US, August 16-20, 2015, ORGN-529.
9. Doan, T. T. T.; Chanthamath, S.; Shibatomi, K.; Iwasa, S. "Highly Enantioselective C-H Insertion Reaction of N-Alkyldiazoacetamides by using Ru(II)-Pheox Complex" *Pacificchem 2015* (The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies), Dec., 15-20th, 2015, Honolulu, Hawaii, USA.
10. Y. Nakagawa, S. Chanthamath, N. Nakayama, H. Goto, K. Shibatomi and S. Iwasa, "Highly enantioselective synthesis of cyclopropane ring fused γ -lactones via intramolecular carbene transfer reactions" *Pacificchem 2015* (The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies), Dec., 15-20th, 2015, Honolulu, Hawaii, USA.
11. Seiya Ozaki, Soda Chanthamath, Kazutaka Shibatomi, Seiji Iwasa, "Ru(II)-Pheox catalyzed carbene transfer reactions of diethyldiazomethylphosphonate" *Pacificchem 2015* (The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies), Dec., 15-20th, 2015, Honolulu, Hawaii, USA.
12. Hamada S. A. Mandour, Soda Chanthamath, Kazutaka Shibatomi, Seiji Iwasa, "Highly Stereoselective Cyclopropanations of Weinreb Amide Derivatives using Novel Ru(II)-Pheox Catalysts" *Pacificchem 2015* (The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies), Dec., 15-20th, 2015, Honolulu, Hawaii, USA.
13. S. Chanthamath, S. Ozaki, K. Shibatomi and S. Iwasa, "Ru(II)-Pheox Catalyzed Asymmetric Cyclopropanation of Diethyl Diazomethylphosphonate with Various Alkenes" *XXVII International Conference of Organometallic Chemistry (ICOMC 2014)*, 2014, 7, Sapporo, Japan.
14. S. Ozaki, S. Chanthamath, K. Shibatomi and S. Iwasa, "Highly Stereoselective Synthesis of *trans*- and *cis*-Cinnamic Weinreb Amides via 1,2-Hydride Migration" *International Conference of Global Network for Innovative Technology (IGNITE2014)*, 2014, 12, Penang, Malaysia.
15. Y. Nakagawa, S. Chanthamath, T. Nakayama, H. Goto, K. Shibatomi and S. Iwasa, "Computational Chemical Analysis for Catalytic Asymmetric Spiral Cyclization and their Application" *International Conference of Global Network for Innovative Technology (IGNITE2014)*, 2014, 12, Penang, Malaysia.
16. H. S. A. Mandour, S. Chanthamath, K. Shibatomi and S. Iwasa, "A Synthesis of Novel Three Member Ring System via Carbene Transfer Reactions" *International Conference of Global Network for Innovative Technology (IGNITE2014)*, 2014, 12, Penang, Malaysia.
17. S. Chanthamath, H. S. A. Mandour, K. Shibatomi and S. Iwasa, "A Synthesis of Novel Ru(II) Complex and its Application for Synthesis of Bioactive Molecules via Carbene Transfer Reactions" *International*

Conference of Global Network for Innovative Technology (IGNITE2014), 2014, 12, Penang, Malaysia.

18. T. T. T. Doan, S. Chanthamath, K. Shibatomi and S. Iwasa, "Highly Enantioselective Synthesis of beta-Lactam Derivatives via Catalytic Asymmetric C-H Insertion" *International Conference of Global Network for Innovative Technology (IGNITE2014), 2014, 12, Penang, Malaysia.*

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：3 0 3 0 3 7 1 2

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()