

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4980536号
(P4980536)

(45) 発行日 平成24年7月18日(2012.7.18)

(24) 登録日 平成24年4月27日(2012.4.27)

(51) Int.Cl.		F I
C07K 16/44	(2006.01)	C O 7 K 16/44
C07D 277/28	(2006.01)	C O 7 D 277/28
C07D 401/06	(2006.01)	C O 7 D 401/06
C07D 417/06	(2006.01)	C O 7 D 417/06
C07K 14/435	(2006.01)	C O 7 K 14/435

請求項の数 15 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-544026 (P2001-544026)
(86) (22) 出願日	平成12年12月6日 (2000.12.6)
(65) 公表番号	特表2003-516423 (P2003-516423A)
(43) 公表日	平成15年5月13日 (2003.5.13)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2000/012310
(87) 国際公開番号	W02001/042787
(87) 国際公開日	平成13年6月14日 (2001.6.14)
審査請求日	平成19年10月25日 (2007.10.25)
(31) 優先権主張番号	09/456,782
(32) 優先日	平成11年12月8日 (1999.12.8)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	501016559 シンジェンタ・パティシペーションズ・アクチエンゲゼルシャフト Syngenta Participations AG スイス国, 4058 バーゼル, シュバルツバルトアレー 215
(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 憲史
(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稜

最終頁に続く

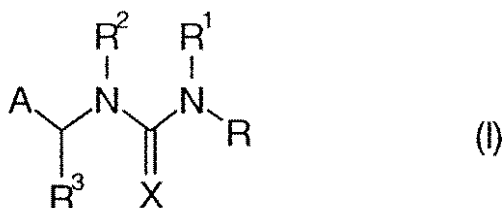
(54) 【発明の名称】 ネオニコチン殺虫剤のイムノアッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

チアメトキサム殺虫剤の量を決定するための、サンプルのイムノアッセイで有用な抗体であって、当該抗体が、(I) 免疫原性キャリアタンパク質にコンジュゲートされたチアメトキサムハプテンでヒト以外の動物を免疫化することによって産生されたポリクローナル抗体であり、そして (II) チアメトキサム殺虫剤に特異的に結合する、抗体、
ここで、当該抗体は、下記式；

【化1】



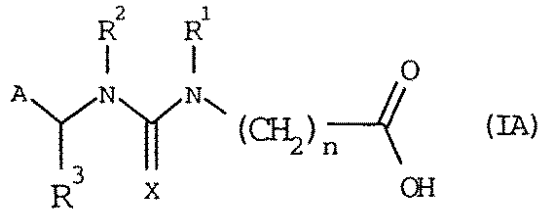
[式中、Aは2-クロロチアゾール-5-イルであり、
RおよびR³は独立的に水素またはC₁-C₄アルキルであり、
R¹およびR²は独立的に水素またはC₁-C₄アルキルであり、またはR¹およびR²はそれらが付着されている窒素原子と一体となってイミダゾリンまたはオキサジアジン環を形成し、そして
XはN-NO₂またはN-CNである]

の化合物に選択性である。

【請求項 2】

下記式の化合物；

【化 2】



10

[式中、A は 2 - クロロチアゾール - 5 - イルであり、

R³ は水素または C₁ - C₄ アルキルであり、

R¹ および R² は独立的に水素または C₁ - C₄ アルキルであり、または R¹ および R² はそれらが付着されている窒素原子と一体となってイミダゾリンまたはオキサジアジン環を形成し、

n は 1 ないし 4 の整数であり、そして

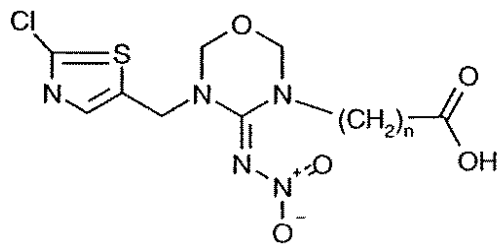
X は N - NO₂ または N - CN である]。

【請求項 3】

下記式の請求項 2 に記載の化合物。

20

【化 3】

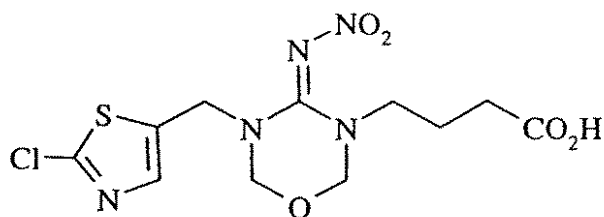


【請求項 4】

下記式の請求項 2 に記載の化合物。

30

【化 4】

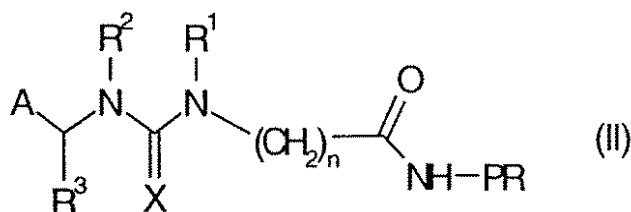


【請求項 5】

下記式のタンパク質コンジュゲート；

40

【化 5】



[式中、A は 2 - クロロチアゾール - 5 - イルであり、

R³ は水素または C₁ - C₄ アルキルであり、

50

R^1 および R^2 は独立的に水素または $C_1 - C_4$ アルキルであり、または R^1 および R^2 はそれらが付着されている窒素原子と一体となってイミダゾリンまたはオキサジアジン環を形成し、

n は 1 ないし 4 の整数であり、

X は $N - NO_2$ または $N - CN$ であり、そして

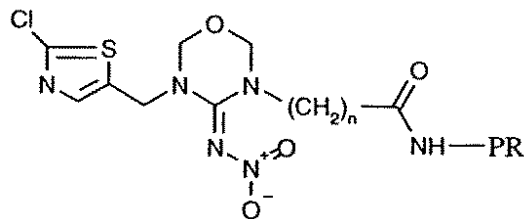
PR は Diphtheria ウイルスからの精製タンパク質誘導体 (PPD、ツベルクリン)、ウシ血清アルブミン、カチオン化ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、オバアルブミンおよびキーホールリンペットヘモシアニンからなる群より選択されるキャリアー分子のタンパク質残基であり；またはアルカリフォスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、および β -ガラクトシダーゼからなる群より選択される酵素残基である]

10

【請求項 6】

下記式の請求項 5 に記載のタンパク質コンジュゲート。

【化 6】



20

【請求項 7】

サンプル中のチアメトキサム殺虫剤の濃度を決定する方法であって、

(a) 当該チアメトキサム殺虫剤に選択性である固定された抗体を有する固相を提供するステップ、

(b) 当該サンプルを、既知の量のチアメトキサム殺虫剤ハプテン - 酵素コンジュゲートの存在下、固定された抗体と接触させるステップ、

(c) ステップ (b) の固相を洗浄し、すべての非結合ハプテン - 酵素コンジュゲートおよびサンプルを除去するステップ、

(d) 当該ハプテン - 酵素コンジュゲートについて特異的な色原性基質を、ステップ (c) の洗浄した固相と反応させ、色原体を生成させるステップ、

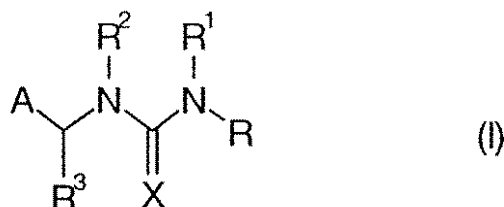
30

(e) ステップ (d) によって生成された色原体の量を測定し、抗体の結合したハプテン - 酵素コンジュゲートの量を決定し、および得られた量より当該サンプル中のチアメトキサム殺虫剤の量を決定するステップ、

の各ステップを含む、方法、

ここで、当該抗体は、下記式；

【化 7】



40

【式中、 A は 2 - クロロチアゾール - 5 - イルであり、

R および R^3 は独立的に水素または $C_1 - C_4$ アルキルであり、

R^1 および R^2 は独立的に水素または $C_1 - C_4$ アルキルであり、または R^1 および R^2 はそれらが付着されている窒素原子と一体となってイミダゾリンまたはオキサジアジン環を形成し、そして

X は $N - NO_2$ または $N - CN$ である]

の化合物に選択性である。

【請求項 8】

50

当該サンプルが、好適な溶媒中で植物繁殖材料を抽出することによって得られる、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

当該植物繁殖材料が種子である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

当該種子が、キャノーラ、ソルガム、コムギ、ワタ、トウモロコシまたはスイートコーンからなる群より選択される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

当該抗体が、免疫原性キャリアータンパク質にコンジュゲートされたチアメトキサム殺虫剤でヒト以外の動物を免疫化することによって産生されるポリクローナル抗体である、請求項 7 に記載の方法。

10

【請求項 12】

当該免疫原性キャリアータンパク質が、Diphtheria ウイルスからの精製タンパク質誘導体 (PPD、ツベルクリン)、ウシ血清アルブミン、カチオン化ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、オバアルブミンおよびキーホールリンペットヘモシアニンからなる群より選択されるキャリアー分子である、請求項 11 に記載の方法。

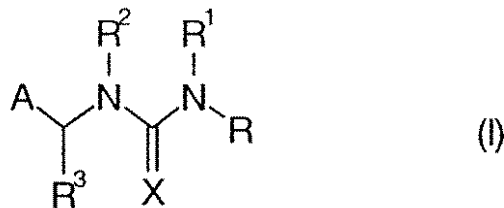
【請求項 13】

チアメトキサム殺虫剤の量を決定するための、サンプルのイムノアッセイに用いられるキットであって、1 または 2 以上の容器中に、

(a) 当該チアメトキサム殺虫剤に選択性である固定された抗体を有する固相、
(b) チアメトキサムハプテンにコンジュゲートされた酵素を含む酵素コンジュゲート、
を組み合わせる含む、キット、
ここで、当該抗体は、下記式；

20

【化 8】



30

[式中、A は 2 - クロロチアゾール - 5 - イルであり、
R および R³ は独立的に水素または C₁ - C₄ アルキルであり、
R¹ および R² は独立的に水素または C₁ - C₄ アルキルであり、または R¹ および R² はそれらが付着されている窒素原子と一体となってイミダゾリンまたはオキサジアジン環を形成し、そして

X は N - NO₂ または N - CN である]

の化合物に選択性である。

【請求項 14】

当該抗体が、免疫原性キャリアータンパク質にコンジュゲートされたチアメトキサムでヒト以外の動物を免疫化することによって産生されるポリクローナル抗体である、請求項 13 に記載のキット。

40

【請求項 15】

該酵素が、ホースラディッシュペルオキシダーゼである、請求項 13 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、農薬のイムノアッセイに、およびそのようなアッセイを実施する抗体および試薬に関する。本発明は、そのようなアッセイを実施する方法に、およびそのような方法を実施するための試薬を含むキットにさらに関する。本発明は、サンプル中のネオニコチノイド殺虫剤の検出および定量への特定の適用を有する。

【0002】

50

殺虫剤

作物で害虫を制御するための合成殺虫剤の使用は、広く実施されている。この実施は高く商業上の成功を得ており、これはそのような制御によって作物収量が増加できることが示されたからである。しかし、殺虫剤の有効な使用は、害虫の抵抗性および環境へ、および作業員への曝露の問題の観点から健全な管理を必要とする。この問題に適用される1つの解決は、在来の急性毒性殺虫剤の必要性を減少させるために、そして環境負荷率を減少させるために、新しい、より高活性の殺虫剤を供給することである。

【0003】

市場で顕著な認知を得ている、ある新しいクラスの殺虫剤は、いわゆる「ネオニコチノイド」殺虫剤である。このクラスの化合物は、例えば、イミダクロプリド、アセタミプリド、およびチアメトキサムであってそれぞれ米国特許番号4742060および5304566およびEP580553A2に記載されたものを含む。

10

【0004】

殺虫剤を植物繁殖材料(plant propagation materials)(例えば種子)に直接に処理することは、単独で、または茎葉またはうねへの殺虫剤の適用と組み合わせて適用されるときに、環境へのおよび作業員への曝露、および害虫の抵抗性の確立の減少の必要性と取り組む適用の対象である。しかし、種子コーティング器具を正確にキャリブレーションし、殺虫剤を齊一に種子材料に適用し、とりわけ殺虫剤の成績および種子ファイトトキシンによる問題を回避することを確保するために、注意が払われなければならない。分析的測定を使用して、種子コーティング装置が正確にキャリブレーションされているか、正確に作動しているか、そして種子の処理されたロットが出荷され得るか決定することができる。

20

【0005】

しかし、種子の殺虫剤の残留の検出のための伝統的な方法は、極端に時間消費性で高価で有り、なぜなら、それらは高度に特別な高価な分析手法、例えば、ガス-液体または高速液体クロマトグラフィーを要するからである。両方のクロマトグラフィー的技術は、高価な装置であって維持するために費用がかかり、そして高度に熟練した技術によって操作されなければならないものを要する。種子処理施設および栽培者は、通常はそのような装置または常勤の人員を有せず、したがって種子サンプルを外部分析実験室に発送しなければならない。サンプルがそのような実験室によって即答式に分析されるとき、処理施設は発送のおよそ24時間後に分析データを受け得る。より迅速でない分析では、より長い遅延がある。これらの遅延は、機械の長時間の無駄な時間をコーティング施設にもたらす。コーティングされた種子の発送がまた遅延する。

30

【0006】

当業界に、既存の測定技術をより低廉に、より効率的そしてより容易に管理可能にする緊急の必要性が存在する。望まれる方法はまた、圃場条件下の実験室外で有用であり、したがってそれらは栽培者または種子処理人員に、種子サンプル上の所定の殺虫剤の存在および濃度についての情報を速やかに容易に提供する。この点で、当該方法が他の産物からの活性農薬材料を識別し、そして種子上に存在する所望の活性成分の定量的決定を可能とすることが重要である。しかし、古典的な分析方法の多くの深刻な限界がまだ存在する。これらの限界のあるものを、イムノアッセイ技術の使用によって克服する。

40

【0007】

農薬のイムノアッセイおよび検出

医学的および獣医学的使用が先ず発達したが、イムノアッセイは農業上の領域でのより多くの応用が見出され始めた。例えば、イムノアッセイは、作物病害、アフラトキシンおよびある種の抗生物質の検出および定量に利用可能である。農薬検出のためのイムノアッセイは、科学文献に記載され(以下参照)、これらはほんの過去10年以内で商業ベースで利用可能となった。

【0008】

イムノアッセイは、高度に特異的な抗体試薬および比較的単純な分析器具により、広範囲の標的材料を検出および/または定量する。装置または操作条件より抗体が、分析特異性

50

を提供する。イムノアッセイはしたがって比較的粗サンプルについて実施することができる。さらに、イムノアッセイ法を、遠隔の、非実験室セッティングでの使用のために最適化し、特別な実験室だけでなく圃場での使用も可能とする。

【 0 0 0 9 】

免疫学的方法は、ある種の除草剤の検出について既知であり、これらは2, 4 - ジクロロフェノキシ酢酸 (Fleeker, J., J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70:874-878(1986))、クロスルフロン (Kelley, M. et al., J. Agric. Food Chem. 33:962-965(1985))、ハロアセトアミド (Winzenburger, P. A. et al. (欧州特許公開EP340198, 1989))、およびジフルベンズロン (Wie, S. I. et al., J. Agric. Food Chem. 30:949-957(1982))、メタラキシル (Newsome, W. H., J. Agric. Food Chem. 33: 528-530(1985))およびパラチオン (Ercegovich, C. D. et al., J. Agric. Food Chem. 29:559-563(1981))を含む種々の農薬を含む。アトラジンの免疫学的検出についての方法がまた記載されている (米国特許番号4530786)。シアナジン、ジクロホップ - メチル、フェンタクロルフエノール、2, 4, 5 - Tおよびテルブトリンについての免疫学的アッセイもまた既知である。

10

【 0 0 1 0 】

前記のすべての免疫学的方法は、適当な抗原 (免疫原) で免疫化された宿主動物 (典型的にはウサギ) から得られたポリクローナル抗血清を利用した。より最近に、アトラジンおよびその誘導体に特異的なモノクローナル抗体 (m A b s) および分解産物、およびそのような m A b s のイムノアッセイにおける使用が開示された (Schlaeppli et al., 欧州特許公開EP365818(1990))。

20

【 0 0 1 1 】

その低分子量のために、殺虫剤は、免疫原性でなく、そして動物宿主から特異的抗体を誘発しない。ゆえに、殺虫剤イムノアッセイの開発は多くのステップ、ハプテンの設計の開始、より高分子量の免疫原性「キャリアー」タンパク質へのコンジュゲーションを許容しながら殺虫剤分子の構造的な特異性を維持する殺虫剤の誘導体を要する。さらに、これらの生産のプロセス中の抗体のスクリーニングのために、化学的構造が動物を免疫化するために使用されるハプテンと異なる、さらなるハプテンをまた調製し得る。最終的にひとたび抗体調製を得られれば (ポリクローナルまたはモノクローナルのいずれか)、十分に感受性のイムノアッセイが開発されるはずである。

30

【 0 0 1 2 】

現代のイムノアッセイで使用される基本的な戦略は、多くの引用文献に記載された (例えば、Voller, A. et al., eds., Immunoassays For The 80's, University Park, 1981; Voller, A., 'The Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)', Diagnostic Horizons 2:1-7, 1978, Microbiological Associate Quarterly Publication, Walkersville, Md.; Voller, A et al., J. Clin. Pathol. 31: 507-520(1978); Butler, J. E., Meth. Enzymol. 73:482-523(1981); Maggio, E. (ed.), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla., 1980) 参照。既知の量の所望のアナライトを使用するキャリブレーション曲線の作成が、それぞれのアプローチに不可欠である。

【 0 0 1 3 】

一般に使用される「標識抗体」法は、エライザ (E L I S A) と称される。ここで、農薬のタンパク質コンジュゲート (「コーティング」または「スクリーニング抗原」と呼ばれる) は、抗農薬抗体が生成される、農薬免疫原中に使用されるキャリアータンパク質と構造的に関係のないタンパク質を使用して調製する。コーティング抗原コンジュゲートは固相支持体、例えば、マイクロプレートウェルの表面上に固定され、反応当たりの固相農薬の固定化量を生じる。既知の量の抗体を試験サンプルと共に添加する。

40

【 0 0 1 4 】

固定された農薬は、限定された数の抗体結合部位について、未知のサンプル中の遊離の農薬と競合する。液体相中の抗体とアナライトの間の相互作用は、抗体の固相農薬への結合を阻害する。固相に結合した抗体は、抗農薬抗体の重鎖の定常領域に特異的な、酵素がコンジュゲートされた第2抗体によって検出される。多くの、酵素が結合した第2抗体は、

50

そのような使用のために、商業的に入手可能である。非結合第2抗体を洗浄後、固定された第2抗体を、結合した第2抗体の量に直接比例的に形成される呈色反応産物を生じる、酵素のための色原性基質を添加することによって典型的には検出する。こうして反応産物の量は、未知サンプル中のアナライトの量に反比例的である。

【0015】

「標識抗体」法の修飾は、コーティング抗原の使用を排除する。酵素イムノアッセイ（EIA）は抗農薬抗体を固相上に固定する。農薬ハプテンは、酵素に共有結合し、そして得られた酵素コンジュゲートを、抗農薬抗体でコートされたマイクロウェルまたは培養管中のサンプルとインキュベーションする。サンプル中の農薬は、固定された抗体に結合する農薬ハプテン-酵素コンジュゲートと競合する。固相を洗浄して非結合材料を除去し、そして抗体が結合した酵素コンジュゲートを色原性基質の添加によって検出する。例えば、Bushway, R.J., L.P.Perkins, S.A.Savage, S.L. Lekousi, and B. S.Ferguson. 1988. Determination of atrazine residue in water and soil by enzyme immunoassay. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 40:674-654; Fleeker, J. R. and L.W. Cook. 1991. Reliability of Commercial enzyme immunoassay in detection of atrazine in water. P. 78-85 in M.Vanderlann, L.H. Stanker, B.E, Watkins, and D.W. Roberts., eds. Immunoassays for Trace Chemical Analysis. ACS Symposium Series 451. Washington D.C.: American Chemical Society参照。

10

【0016】

圃場または種子処理施設で実施できる、活性成分、例えば殺虫剤で処理した種子を分析する方法の農業分野での必要性が存在する。

20

【0017】

本発明は、抗ネオニコチノイド抗体を生成するためのネオニコチノイドハプテンおよび免疫原、並びにイムノアッセイによるサンプル中の1または2以上のネオニコチノイド殺虫剤の存在を定量するための抗体、方法、試薬、およびキットを提供する。本発明は、植物繁殖材料、例えば、種子に適用されるネオニコチノイド殺虫剤の濃度の定量への特定の適用を有する。

【0018】

本発明のイムノアッセイ方法によって、種子処理施設での人員が、適用される活性成分の量を定量的に測定することが可能となり、ここで、ネオニコチノイド殺虫剤が種子に適用される。該方法は、種子から活性成分の迅速な抽出および迅速な抽出溶液のイムノアッセイに基づく測定に関係する。これの測定を使用して種子コーティング装置が正確にキャリアレーションされたか、正確に作動しているか、および種子の処置されたロットが出荷され得るか決定することができる。このアッセイを、通常の実験室的装置および試薬のみを必要として、操作するほど簡単であるように設計する。したがって、イムノアッセイを実施する経験のない人員が、少しの練習試行の後に、試験を首尾よく実行できる。

30

【0019】

抗原性ネオニコチノイドコンジュゲート（免疫原）を、ネオニコチノイド農薬ハプテンのキャリアー分子、例えば、Diphtheriaウイルスからの精製タンパク質誘導体（PPD、ツベルクリン）、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、オバアルブミンまたはキーホールリンペットヘモシアニンのネオニコチノイドハプテンへのコンジュゲーションによって作成することができるが見出された。誘導された材料、例えば、誘導されたウシ血清アルブミン、カチオン化ウシ血清アルブミン等のコンジュゲートをまた生成することができる。A. Muckerheide, R. Apple, A. Pesce and J. G. Michael(1987)J. Immunol. 138:833-837参照。これらの免疫原を次いで、収集され得るネオニコチノイドハプテンに対する抗体を産生する宿主動物に注射することができる。これらの抗体を次いで種々のイムノアッセイ手法に利用し、殺虫剤または抗体のいずれかを標識するための種々の既知のマーカーを使用して、対応するネオニコチノイド殺虫剤を検出し得る。イムノアッセイのある実施態様では、ネオニコチノイド殺虫剤誘導体または抗体のいずれかを固定する。ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の両方を、本発明の実施で使用することができる。

40

50

該抗体は、種子コーティング製剤に含まれる他のネオニコチノイド殺虫剤を含む他の農薬活性成分の存在下でさえも、所望のネオニコチノイド殺虫剤（複数含む）に選択的に結合することを示すことができる。

【0020】

本発明の実施に適用することができる、サンプル中のネオニコチノイド殺虫剤の測定のための検出方法は、バイオセンサーおよび酵素的、蛍光、化学発光およびラジオイメトリックシステムを含む。そのようなアッセイは、異種性または同種性フォーマットを使用し得、そしてマイクロウェルプレート、培養管、および固相としてのラテックスビーズまたは粒子を使用し得る。

【0021】

本発明のイムノアッセイを使用し、サンプル、例えば植物繁殖材料におけるネオニコチノイド殺虫剤化合物、例えばイミダクロプリド、ニテンピラム、アセタミプリド、チアメトキサム、チアクロプリドおよびクロチアジンの濃度を決定する。

【0022】

本発明は、ネオニコチノイド殺虫剤の存在についてサンプルを試験するためのイムノアッセイを提供する。そのようなイムノアッセイでは、ネオニコチノイド（抗原）/抗体反応を、反応産物の検出を可能とする、抗原または抗体のいずれかを標識する種々のマーカを使用して、種々の方法によって検出することができる。さらに、抗原または抗体のいずれかの固定は、多くの場合に検出を容易化する。

【0023】

抗原/抗体アッセイを、異種性および同種性の、2種のカテゴリーに一般に分類することができる。異種性アッセイは、反応産物の検出に先立ち、結合標識成分の遊離標識成分からの分離を要する。同種性アッセイは、そのような分離ステップを要しない。該アッセイはさらに（1）例えば、抗原が標識抗体について固相抗原と競合する場合、または抗原が標識抗原と、固相抗体について競合する場合、競合的であり、または（2）標識と抗体または抗原の間に直接的な関連性がある場合、非競合的であることができる。

【0024】

本発明の実施でイムノアッセイ法を使用して、サンプル中のネオニコチノイド殺虫剤を検出ことができ、これらは酵素、蛍光化学発光およびバイオセンサーイムノアッセイ、並びにラジオイムノアッセイを含む。エライザ（ELISA）において、本発明に従って、所望のネオニコチノイド殺虫剤（複数含む）に対応するハプテンを、酵素で直接的に標識し、または酵素で標識された抗体であって適当な条件で基質との反応を触媒するものを使用によって間接的に標識することができる。酵素活性は典型的には、呈色反応産物、すなわち、目によって容易に検出され、または分光器または反射率的手段によって測定され得る呈色終点の形成によって検出する。

【0025】

本発明での使用のための蛍光イムノアッセイ技術では、所望のネオニコチノイド殺虫剤（複数含む）に対応するハプテンを、蛍光色素で直接的に、または蛍光色素標識抗体で間接的に標識することができる。蛍光色素は、放射（例えば、紫外線）を吸収し、それによって励起され、そして光（例えば可視光）を放射する色素である。

【0026】

本発明のある実施態様では、サンプル中のネオニコチノイド殺虫剤の濃度を決定する方法は以下のステップを含む：

【0027】

- (a) 当該ネオニコチノイド殺虫剤に選択性である固定された抗体を有する固相を提供するステップ、
- (b) 当該サンプルを、既知の量のネオニコチノイド殺虫剤ハプテン - 酵素コンジュゲートの存在下、固定された抗体と接触させるステップ、
- (c) ステップ(b)の固相を洗浄し、すべての非結合ハプテン - 酵素コンジュゲートおよびサンプルを除去するステップ、

10

20

30

40

50

(d) 当該ハプテン - 酵素コンジュゲートについて特異的な色原性基質を、ステップ(c)の洗浄した固相と反応させ、色原体を生成させるステップ、

(e) ステップ(d)によって生成された色原体の量を測定し、抗体の結合したハプテン - 酵素コンジュゲートの量、およびそれゆえに当該サンプル中のネオニコチノイド殺虫剤の量を決定するステップ。

【0028】

ある実施態様ではこのイムノアッセイを、抗体がコーティングされた管、ネオニコチノイドハプテン - 酵素コンジュゲート、酵素基質、および比色シグナルの生成を終結させる溶液を含んでいる、キットの形態で供給する。

【0029】

ポリクローナル抗体の使用に言及して本発明をしばしば説明する一方、当業者はまた、ポリクローナル抗体の使用への別形として、モノクローナル抗体を使用し得ることを認識する。用語「抗体」はここでは一般に、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を意味するために使用する。

【0030】

本発明の実施での使用のためのネオニコチノイド殺虫剤へのモノクローナル抗体は、当業者に周知の、免疫化およびハイブリドーマ培養技術を使用して作成する。好適なハイブリドーマ細胞株は、抗体を産生している細胞およびハツカネズミ種から誘導したミエローマ細胞の融合によって好ましくは生産する。抗体を産生している細胞は好ましくは脾臓細胞である。任意の好適なミエローマ細胞株を使用し得るが、しかしナンバーが一般に利用されるよく特性把握された細胞株の使用が望ましい。

【0031】

同様に、本発明の実施での使用のためのネオニコチノイド殺虫剤へのポリクローナル抗体をまた、当業者に周知の技術を使用して作成する。

【0032】

本発明はまた、少なくとも1種のネオニコチノイド殺虫剤に結合するポリクローナルIgG抗体であって：(a)ネオニコチノイド殺虫剤または生物学的に許容されるキャリアータンパク質に結合された免疫学的に等価なものを含む予め決定された量の組成物を宿主に投与するステップ、(b)宿主から血清を収集するステップ、および(c)該血清からIgG抗体を精製するステップ、

を含む方法によって産生される、抗体調製を提供する。

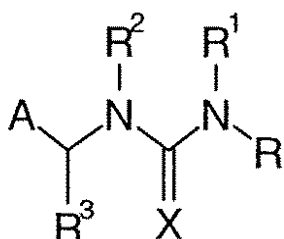
【0033】

前記の様に、本発明のイムノアッセイには、植物繁殖材料に適用されたネオニコチノイド殺虫剤の量を検出するときの特定の適用を有する。用語「植物繁殖材料」は植物のすべての発生部分、例えば後者の増殖に使用することができる種子および栄養植物体、例えば挿し木および塊茎(例えばジャガイモ)を意味すると理解される。例えば、種子(厳格な意味で)、根、果実、塊茎、球根、根茎、および植物の一部を言及し得る。発芽後または土壌から出芽後に移植されるべき発芽した植物および幼植物をまた言及し得る。浸漬による全体または一部の処理によって移植の前に幼植物を保護し得る。

【0034】

ある実施態様では、本発明のアッセイによって検出可能なネオニコチノイド殺虫剤は以下の式によって表され、

【化10】



(I)

10

20

30

40

50

ここで、Aは2 - クロロピリド - 5 - イルまたは2 - クロロチアゾール - 5 - イルであり、

R³ および R³ は、独立的に水素またはC₁ - C₄ アルキルであり、

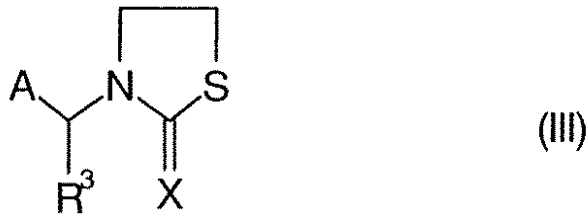
R¹ および R² は、独立的に水素またはC₁ - C₄ アルキルであり、または R¹ および R² は、付着されている窒素原子と一体となってイミダゾリジンまたはオキサジアジン環を形成し、そして

XはN - NO₂ またはN - CNである。

【0035】

別の実施態様では、本発明のアッセイによって検出可能なネオニコチノイド殺虫剤は、以下の式によって表され、

【化11】



ここで、A、R³ および X は上記式 (I) と同じ意味である。

【0036】

好ましい実施態様では、本発明のイムノアッセイはネオニコチノイド殺虫剤についてのポリクローナル抗体を使用する。これらの抗体は、免疫化した動物の血清から得ることができる。免疫化を免疫原（ハプテン - PPD 抗原性コンジュゲート）を、抗体を産生する種、典型的には哺乳動物および好ましくはウサギまたはヒツジに注射することによって達成することができる。典型的には、当初に注射し、次いで一連の次の追加免疫注射をし、抗体応答を最大化する。最適には、注射養生法（injection regime）は、ニュージーランドホワイトラビットに与えられる複数投与である。注射される免疫原の量は変化され、しかし、抗体の検出可能な量を誘発するのに十分でなければならない。抗体産生を、EIA、ELISA または間接蛍光イムノアッセイアッセイを使用して試行採血で得られる血清を分析することによって確認することができる。

【0037】

既知のイムノメトリックアッセイで使用されるのと同じ標識を使用し、本発明で使用するハプテンを標識することができる。これらのうち、酵素、例えばアルカリフォスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、および - ガラクトシダーゼを含むレポーター分子（RM）を述べ得る。加えて、蛍光、発光または放射活性標識、例えば、フルオレセイン、ローダミン、ルミノール、アクリジウムおよび放射活性同位体、¹²⁵I 等、またはコロイド粒子、例えば金およびセレンウム等を使用することができる。最後に、ランタニドキレートフルオロフォア、例えば、ユーロピウムおよびテルビウムを使用し、時間分解性蛍光シグナルを発生させることができる。最も一般的な酵素的マーカーは、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）およびアルカリフォスファターゼである。

【0038】

ある実施態様では、分光光度計を使用して、サンプル中のネオニコチノイドの量を検出する。しかし、本発明の方法を、当業者は適合させ、色原性ディテクターの他の型で実施することができる。同様に、検出可能反応産物は、発色団に限定されず、前記のような他の標識を含む。

【0039】

以下の式 (IA)、(IB) および (IIA) のハプテンが、抗原性ネオニコチノイドコンジュゲート（免疫原）およびアッセイコンジュゲートを生成するのに有用であると見出された。

ハプテン (IA)

10

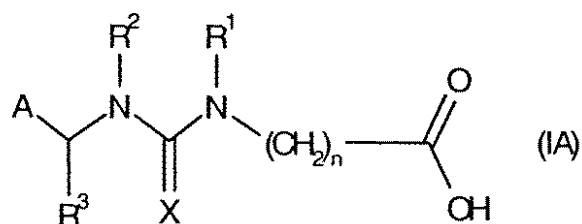
20

30

40

50

【化12】



【0040】

ここで、Aは2-クロロピリド-5-イルまたは2-クロロチアゾール-5-イルであり 10

R³は、水素またはC₁-C₄アルキルであり、

R¹およびR²は独立的に水素またはC₁-C₄アルキルであり、またはR¹およびR²は、それらが付着されている窒素原子と一体となってイミダゾリジンまたはオキサジアジン環を形成し、

nは1ないし5の整数（好ましくは3ないし5の整数）であり、そして

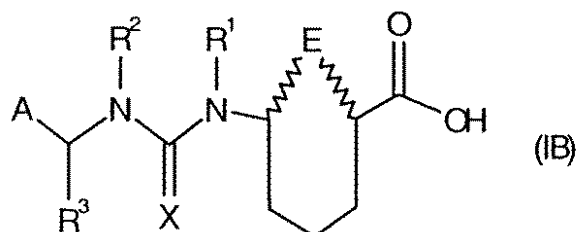
XはO、N-NO₂またはN-CNである。

【0041】

ハプテン (IB)

【化13】

20



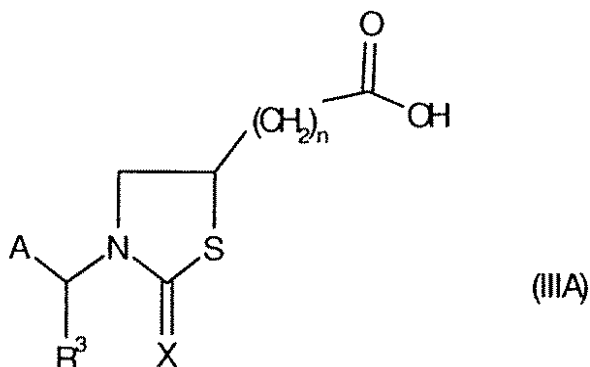
ここで、A、R¹、R²およびXは式 (IA) で定義したのと同じ意味であり、そして

Eは、共有単結合であり、または式 -(CH₂)_m- の連結部分であり、ここでmは1ないし3の整数である。 30

【0042】

実施例1：ハプテン (IIIA)

【化14】



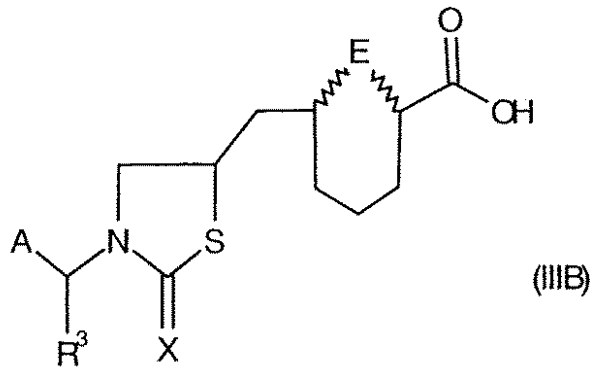
40

ここで、A、R³、Xおよびnは式 (IA) で定義したのと同じ意味である。

【0043】

ハプテン (IIIB)

【化15】



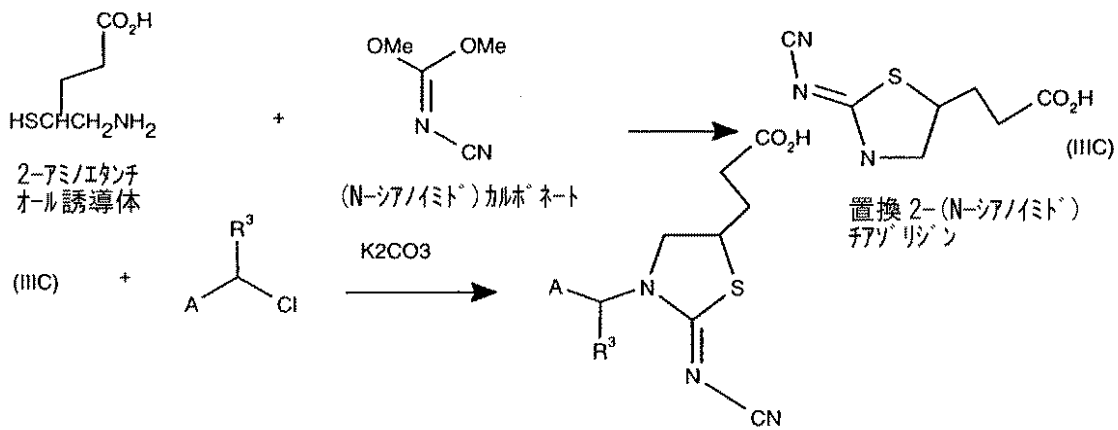
10

ここで、A、R³、およびXは式(I A)で定義したのと同じ意味であり、Eは式(I B)で定義したのと同じ意味である。

【0044】

式(III A)および(III B)のハプテンを以下の方法論と類似するように調製することができる：

【化16】



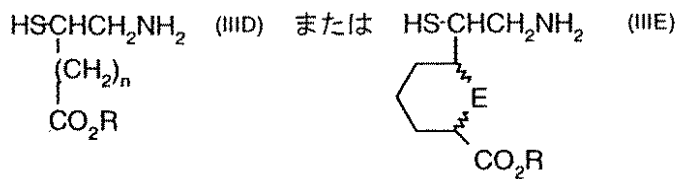
20

【0045】

所望のハプテン(III A)または(III B)を以下の式の化合物から選択される適当な2-アミノエタノール誘導体を使用することによって調製し：

30

【化17】



W

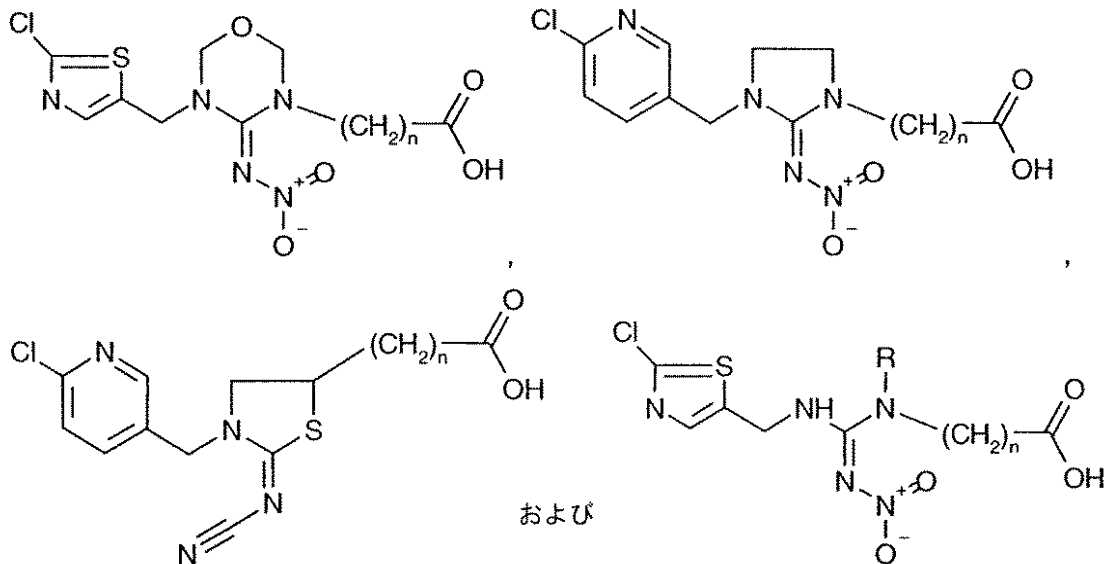
ここでRは前記式(I)についてと同じ意味である。

【0046】

40

以下のハプテンが本発明の実施で特に有用であるとわかり：

【化18】



10

ここで、 n はそれぞれの場合に、1ないし5の整数であり、好ましくは3ないし5の整数である。

【0047】

抗原性ネオニコチノイドコンジュゲート（免疫原）およびアッセイコンジュゲートを、それぞれの場合に応じて、ネオニコチノイド農薬ハプテンのキャリアー分子またはレポーター分子へのコンジュゲーションによって作成することができ、当業者に既知の技術を使用し得る。2つの基本的アプローチをとった。その第1は、コンジュゲートの一部となるリンカーの使用である。これらのリンカーは、ホモ二官能性またはヘテロ二官能性であり、そして例えば、基質タンパク質中のシステイン部分のチオール基を介してジスルフィド結合を形成することのできるもの、またはN-末端アミノ基またはアミノ側鎖またはリジン残基および活性化アシル部分の間のアミド結合、例えばスクシンイミジルエステルの形成のできるものを含む。一般に、このアプローチは、リンカー上の高度に反応性の官能基に関係し、そしてコンジュゲーションのための基質に関して妥当に軽便である。しかしより反応性の小さいことがある官能基、例えば、ヒドラゾン形成の可能であるものを使用することがしばしば有用である。

20

30

【0048】

2種のタンパク質部分をコンジュゲートさせるの特に有用である、第2のアプローチは、例えば、コンジュゲートの1のメンバーのカルボキシル部分の、他方の遊離アミノ基との反応によって、新しいペプチド結合の形成をもたらすカルボジイミドのような脱水剤を使用する。この場合に、該試薬はコンジュゲートの一部とならない。

【0049】

カルボキシル基は活性化されないから、この反応は特に容易ではない；カルボジイミドは、活性中間体を提供し、そして水のエレメントを除去することによって平衡を移動させ、ペプチド結合を形成する。

40

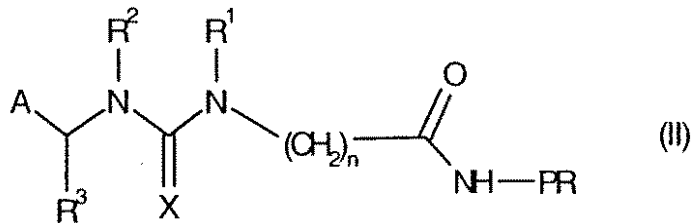
【0050】

コンジュゲーションへの両方のアプローチは、一般に水性溶媒中で実行され、なぜなら、コンジュゲートを形成しているタンパク質材料は容易に変性されるからである。タンパク質は、水性環境中で安定であるべく設計し、そして溶媒、例えば、水性媒体にかなり類似であると考えられる、エタノール中でさえも変性すると知られる。また、タンパク質コンジュゲート構成要素は、非水性溶媒中で比較的不溶性である傾向がある。

【0051】

以下の式のパプテンコンジュゲートは、本発明の実施に有用であると見出され：

【化19】



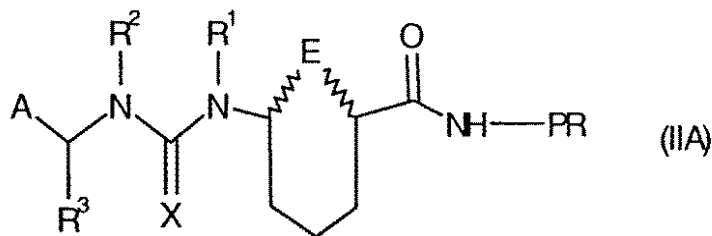
ここで、A、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 n およびXは前記式(I A)中と同じ意味であり、そしてPRはタンパク質残基であり：(1)キャリアー分子、例えば、Diphtheriaウイルスからの精製タンパク質誘導体(PPD、ツベルクリン)、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、オバアルブミンまたはキーホールリンペットヘモシアニンであって免疫原の場合におけるもの、または(2)レポーター分子(RM)例えば、アルカリフォスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、および β -ガラクトシダーゼである。

10

【0052】

加えて、以下の式のパプテンコンジュゲートは同様に有用であり：

【化20】



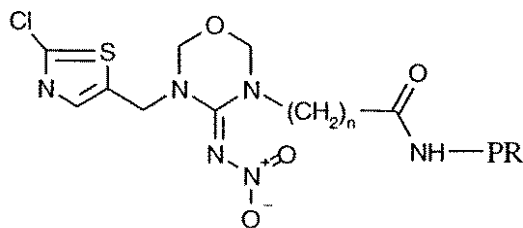
20

ここでA、 R^1 、 R^2 、 R^3 、EおよびXは上記式(I B)中と同じ意味である。

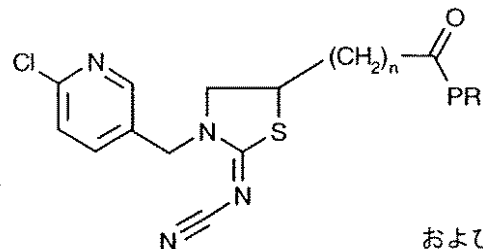
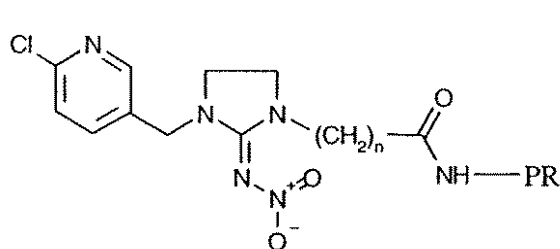
【0053】

以下コンジュゲートが、本発明の実施に特に有用であると見出され：

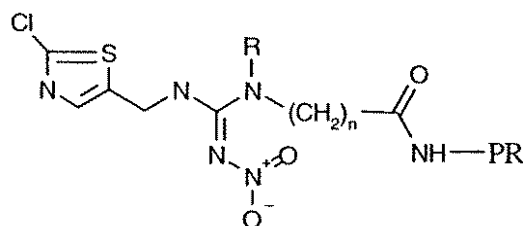
【化21】



30



40



ここでそれぞれの場合の n は1ないし5の整数であり、好ましくは3ないし5の整数であ

50

る。

【0054】

試験されるべきサンプル中の抗原性ネオニコチノイドまたはハブテン - R Mコンジュゲートを結合するための本発明のプロセスで使用する非標識ポリクローナル抗体を、イムノメトリックアッセイで一般に使用される任意の支持体上に固定化することができる。これらに含まれ得るのは、濾紙、ラテックまたはポリスチレンビーズおよびポリエチレン、ポリスチレン、ポリプロピレンまたは他の適当なマイクロウェルプレートまたは試験管である。この支持体を、天然または合成起源の任意のポリマー、または非晶質材料、例えばガラスから作成することができる。反応ストリッピングのためにニトロセロロースまたはナイロンの膜、そしてビーズまたはマイクロプレートのためにポリビニル、ポリプロピレン、ポリスチレンまたは他のプラスチックを使用するのが有利である。アガロース、アクリルアミドまたはラテックスに基づくゲルまたは粒子もまた使用することができる。加えて、当業界で既知の任意のイムノクロマトグラフィ装置、試験ストリッピングおよびラテラルフロー装置を本発明のプロセスに適合させることができる。好適なラテラルフロー装置には、米国特許4366241に開示されたラテラルフロー装置の型を述べることができる。抗体をそのような材料に結合させる技術は、当業者に周知である。支持体に結合された抗体を得る好適なソースは、例えば、Beacon Analytical Systems, Inc. (Portland, Maine) である。

10

【0055】

アッセイでの使用のための種子サンプルを調製するために、ネオニコチノイド処理したロットからの種子の代表のサブサンプル（例えば、5ないし100グラムのキャノーラ種子；10ないし200グラムのソルガム、コムギ、ワタ、トウモロコシまたはスイートコーン種子）を好適な溶媒、例えばアセトン、アセトニトリル、エタノール、イソプロパノール、メタノール、または種々のパーセンテージの水とのこれらの溶媒の混合物に分散させる。好適な溶媒水混合物は、例えば、1ないし50% MeOH/H₂Oおよび1ないし20% アセトニトリル/H₂Oを含む。分散した種子を、攪拌して混合し、それから約20分間超音波バスに置き、次いでさらに攪拌する。内容物を処理に付する。既知の一部の液体抽出物を取り、既知量の溶液、例えば、1%アセトニトリル/水に添加する。抽出物をさらに希釈し、キャリブレーション曲線の範囲に抽出したネオニコチノイドの濃度をもっていく。1000ないし60000倍の希釈が有用であると見出された。イムノアッセイは実行におよそ35分かかる。分析のため抽出物の抽出および調製はおよそ30分かかる。したがって種子サンプルをおよそ1時間と5分で抽出、分析することができる。ある実施態様では、2種の種子サンプル（種子サンプルにつき5サブサンプルまで）を1度に分析することができる。

20

30

【0056】

本発明に従うイムノアッセイで、約1万ppmないし1/2ppbのネオニコチノイド殺虫剤の濃度を検出することができる。しかし、該方法は、サンプルまたはサンプル抽出物中のネオニコチノイド殺虫剤の量がキャリブレーション曲線の範囲内に入り、または入るように適当に希釈され得る限り、存在する任意の量のネオニコチノイド殺虫剤に好適である。

40

【0057】

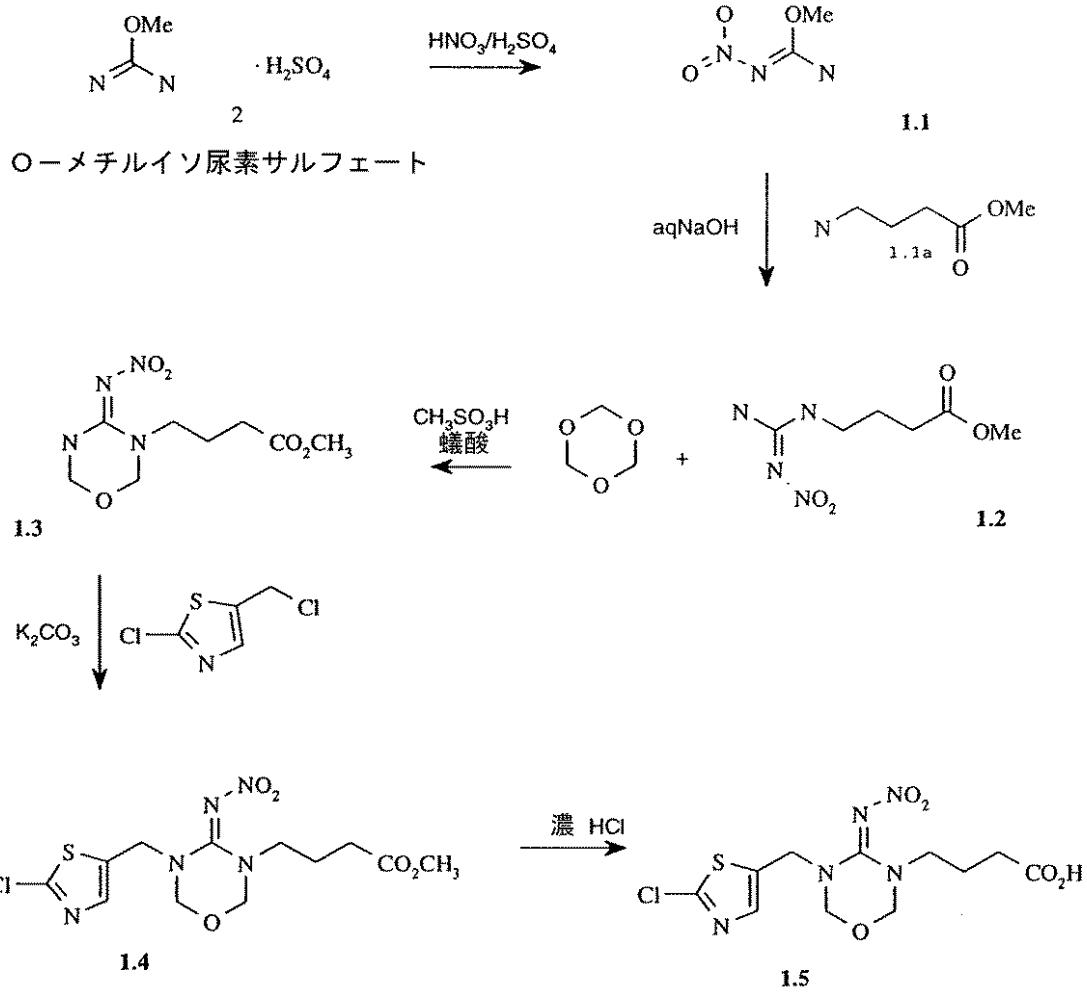
抗原の調製、ポリクローナル抗体の産生およびイムノアッセイを以下の非限定的実施例によってより詳細に例示する。

【0058】

実施例

実施例1 チアメトキサムハブテンのための合成手法

【化22】



10

20

【 0 0 5 9 】

1 . 1 2 - メチル - 1 - ニトロイソ尿素

O - メチルイソ尿素サルフェート (3 8 . 5 g)

を硝酸 (1 2 0 m l) / 硫酸 (2 8 0 m l) 混合物に 0 で溶解し、そして 0 で 2 時間
 攪拌する。該混合物を破碎水に注意深く攪拌しながら注ぎ、それから濾過によって破碎水
 を除去する。針状結晶 d を酢酸エチルに溶解し、そして炭酸カリウムを添加して溶液をアル
 カリ性にする。溶液を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過する。濾液を濃縮し、白色粉末
 を得る (5 g) 。

【 0 0 6 0 】

1 . 2

3 g のメチル 4 - アミノブチレートヒドロクロリド (1 . 1 a) および 1 5 m l の水から
 溶液を調製する。p H を、溶液をアイスバスで冷却しながら、2 N NaOH の滴状の添
 加によって 1 1 に調節する。反応フラスコに p H 電極および温度計を装着し、そして得ら
 れた透明塩基性溶液を急速に攪拌し、2 - メチル - 1 - ニトロイソ尿素 (2 . 3 8 g) を
 少量ずつ添加し、溶液の温度を 2 以下に保持する。添加を完了して、反応物を 0 で 1
 . 5 時間攪拌する；p H は 9 . 6 で安定化した。THF (1 m l) を添加し、そしてさら
 に 2 時間攪拌する。反応物を水で希釈し、酢酸エチルに注ぐ。有機相を分離の後、有機フ
 ラクションを硫酸マグネシウムで乾燥し、溶液を濾過する。濾液を濃縮し、透明オイルを
 得る。粗オイルを 3 : 1 のジクロロメタン / アセトニトリルで溶出させるシリカゲル上
 でフラッシュクロマトグラフィーし、7 5 0 m g の所望の産物を白色固体として得る。

【 0 0 6 1 】

1 . 3

30

40

50

1.2からの産物(1.44g)をパラホルムアルデヒド(422mg)、メタンスルホン酸(.023ml)、および蟻酸(10ml)と合わせ、そして55で15時間加熱する。反応物を減圧で濃縮する。得られた褐色のオイルをトルエン中に懸濁し、そして溶液を共沸的にストリッピングし乾燥させる。得られたオイルを1:1:1のTHF/ジオキサン/アセトニトリルに溶解し、そして過剰のジアゾメタンで処理する。この溶液を30分間攪拌し、反応物を酢酸と処理する。反応混合物をオイルに濃縮する。酢酸エチル中にオイルを再構成し、薄い重炭酸ナトリウム溶液で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、そしてオイルに再濃縮する。このオイルを3:1のジクロロメタン/アセトニトリルにおけるフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、658mgの所望のオキサジアジンアミンブチルエステル(1.3)を透明オイルとして提供する。

10

【0062】

1.4

1.3からの産物(1.1g)dをアセトニトリル(50ml)に溶解し、そして3gの炭酸カリウムを添加する。クロロメチルクロロチアゾールを1度に添加し、反応混合物を55で20時間加熱する。反応混合物を室温に冷却し、そして除去して固体を除去する。得られた褐色のろ液をオイルに濃縮する。オイルを3:1のジクロロメタン/アセトニトリルにおけるフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、894gの所望の化合物を黄褐色オイルとして得る。

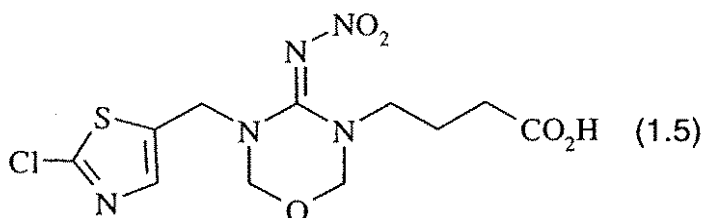
【0063】

1.5

8mlの濃HClおよび1mlの水中に化合物1.4(372mg)を溶解し、室温で6時間攪拌する。反応混合物を水で希釈し、そして4.5のpHとなるまで1N NaOHの添加によって注意深く塩基性化する。酢酸エチルで抽出し、そして有機フラクションを硫酸マグネシウムで乾燥する。乾燥有機フラクションをオイルに濃縮し、そして1:1のジクロロメタン/アセトニトリルのフラッシュクロマトグラフィーによって精製し、所望の産物1.5を得る(100mg)。

20

【化23】



30

【0064】

実施例2-5 チアメトキサムハブテン

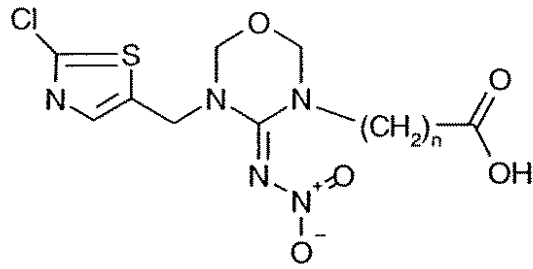
実施例1の合成方法論を使用して、中間体1.1aを式 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{R}$ (1.1b)の適当なアナログ化合物で置換することによって、表1に示す以下のチアメトキサムハブテンを調製し、ここでnは1ないし5の整数であり、RはHまたは $\text{C}_1 - \text{C}_4$ アルキルである。

40

【0065】

表1

【表1】



実施例	n
2	1
3	2
4	4
5	5

10

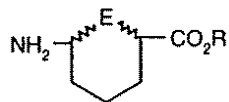
【0066】

実施例 6 - 9 チアメトキサムハプテン

実施例 1 の合成方法論を使用して、中間体 1 . 1 a を適当な下記式のアナログ化合物 (1 . 1 c)

20

【化 2 4】



(ここで E は共有単結合または連結部分 - (CH₂)_m - であり、ここで m は 1 ないし 3 の整数であり、R は H または C₁ - C₄ アルキルである)

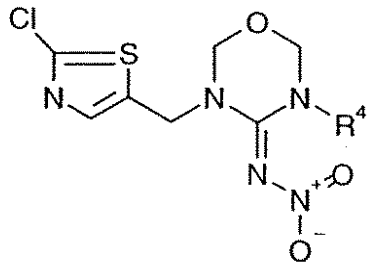
で置換することによって、表 2 に示す以下のチアメトキサムハプテンを調製する。

【0067】

表 2

30

【表 2】

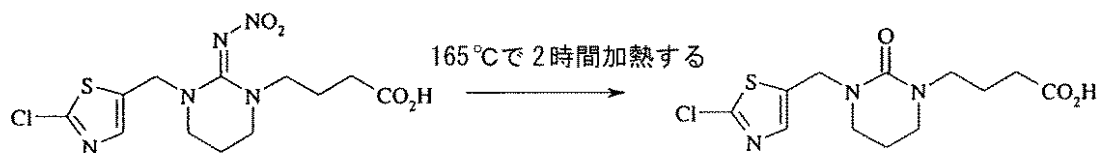


実施例	R ¹
6	
7	
8	
9	

【 0 0 6 8 】

実施例 10 デス - ニトロイミノチアメトキサムハプテンの合成手法

【 化 2 5 】



【 0 0 6 9 】

手法

チアメトキサム - 酪酸ハプテン (1 0 0 m g 、 0 . 2 7 5 m m o l) およびアニソール (6 . 5 m l) を、マグネチックスターラーおよび還流コンデンサーを備えた 1 0 m l 丸底フラスコ中で合わせる。フラスコをオイルバスに置き、そして 2 時間 1 6 5 で加熱する。アニソールを 5 0 で 5 時間減圧で除去する。得られたオイル産物 (9 0 . 2 m g) は H P L C 分析によれば 9 3 % 純度である。

【 0 0 7 0 】

特性把握のための分光学的データ

10

20

30

40

50

【表 3】

HPLC: Keystone Scientific Aquasil C-18 5u (25 x 0.46 cm); アセトニトリル : 20 mM リン酸 (40:60); 1.0 ml/分 ; T=40C; UV @ 240 nm (BW = 100 nm); 稼働時間 : 13 分 ;
リテンションタイム : 4.6 分

TLC: (ジオールゲル)ジカロメタン/アセトニトリル , 2:1 Rf = 0.25.

$^1\text{H NMR}$ (CD_3CN , 300MHz) : δ 7.43 (t, 1H), 4.78 (s, 4H), 4.75 (s, 4H), 4.48 (d, 2H), 3.29 (t, 2H), 2.27 (t, 2H), 1.73 (q, 2H).

10

EI/DEP マススペクトル : m/z 319 (M+).

燃焼分析 : 理論値 : C, 41.32; H, 4.41; N, 13.14;

実測値 : C, 40.13; H, 4.43; N, 12.99

【 0 0 7 1 】

実施例 11 - 18 デス - ニトロイミノチアメトキサムハブテン

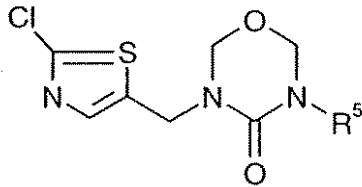
20

実施例 10 の合成方法論を使用して、実施例 1 で得た化合物を実施例 2 - 9 の適当なアナログ化合物で置き換えることによって、表 3 に示す以下のデス - ニトロイミノチアメトキサムハブテンを調製する。

【 0 0 7 2 】

表 3

【表 4】



実施例	R^5
11	$-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
12	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
13	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
14	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
15	
16	
17	
18	

10

20

30

【0073】

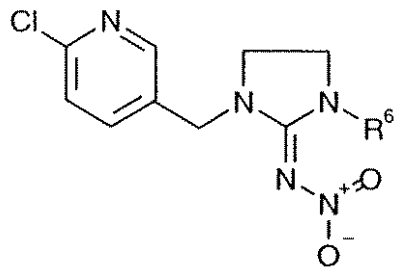
実施例19 - 27 イミダクロプリドハプテン

実施例1の合成方法論を使用して、1.2で得たニトログアニジル誘導体または実施例2-9に示したような式1.1bまたは1.1cの適当なアナログで中間体1.1aを置き換えることによって得たそのアナログの使用によって、表4に示す以下のイミダクロプリドのハプテンを調製する。

【0074】

表4

【表5】



実施例	R^6
19	$-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
20	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
21	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
22	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
23	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
24	
25	
26	
27	

10

20

30

【0075】

実施例 28 - 36 デス - ニトロイミノイミダクロプリドハプテン

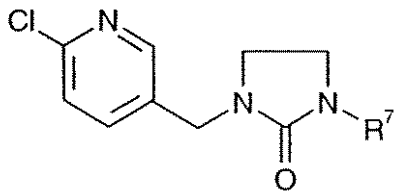
実施例 10 の合成方法論を使用して、実施例 1 で得た化合物を実施例 19 - 27 の適当なアナログ化合物で置き換えることによって表 5 に示す以下のデス - ニトロイミノイミダクロプリドハプテンを調製する。

【0076】

表 5

【表 6】

40



実施例	R^7
28	$-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
29	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
30	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
31	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
32	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$
33	
34	
35	
36	

10

20

30

【0077】

実施例 37 - 45 クロチアジンハプテン

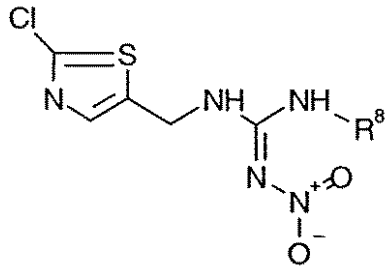
実施例 1 の合成方法論を使用して、1.2 で得たニトログアニジル誘導体または中間体 1.1 a を実施例 2 - 9 に示すような式 1.1 b または 1.1 c の適当なアナログで置き換えることによって得たそのアナログの使用によって、表 6 に示す以下のクロチアジンのハプテンを調製する。

【0078】

表 6

【表 7】

40



実施例	R ⁸
37	-CH ₂ CO ₂ H
38	-CH ₂ CH ₂ CO ₂ H
39	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CO ₂ H
40	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CO ₂ H
41	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CO ₂ H
42	
43	
44	
45	

10

20

30

【 0 0 7 9 】

実施例 4 6 - 5 4 デス - ニトロイミノクロチアジンハプテン

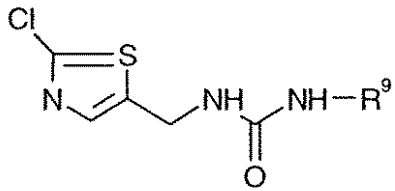
実施例 1 0 の合成方法論を使用して、実施例 1 で得た化合物を実施例 3 7 - 4 5 の適当なアナログ化合物で置き換えることによって表 7 に示す以下のデス - ニトロイミノクロチアジンハプテンを調製する。

【 0 0 8 0 】

表 7

【表 8】

40



実施例	R^9	
46	$-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$	10
47	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$	
48	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$	
49	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$	
50	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$	
51		20
52		
53		
54		30

【 0 0 8 1 】

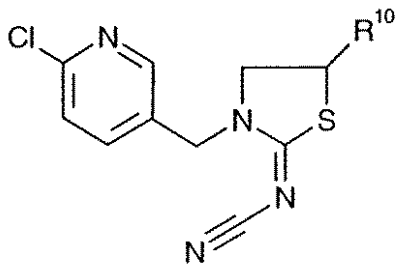
実施例 55 - 63 チアクロプリドハプテン

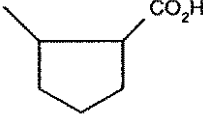
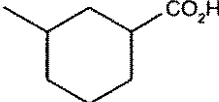
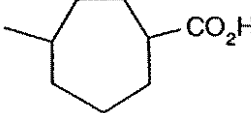

式 (I I I A) および (I I I B) のハプテンに特異的な合成方法論を使用して、表 8 に示すクロチアジンの以下のハプテンを調製する。

【 0 0 8 2 】

表 8

【 表 9 】



実施例	R ¹⁰
55	-CH ₂ CO ₂ H
56	-CH ₂ CH ₂ CO ₂ H
57	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CO ₂ H
58	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CO ₂ H
59	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CO ₂ H
60	
61	
62	
63	

10

20

30

【0083】

実施例64 チアメトキサム免疫原の調製

64.1

0.01M PBS、pH7.4中の精製タンパク質誘導体（ツベルクリン、PPD）の溶液を1mg/mlの濃度に調製する。0.5mlアリコートのこの溶液のpHを、0.1M HClで4.5-5.0に調節する。

【0084】

64.2

250μlの0.1M 2-(N-モルフォリノ)-エタン sulfon酸、pH4.5中に、実施例1からのチアメトキサムハプテン（1mg）を溶解する。ハプテンおよびPPD溶液を合わせる。

【0085】

64.3

1mgの1-(ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミドヒドロクロリド（EDC）を100μlの蒸留した、脱イオン水に溶解する。ただちにEDC溶液を3.2のハプテン-PPD溶液に添加する。ハプテン-PPD-EDC溶液をローテーションによって室温で2時間混合する。反応混合物を1000-2000ダルトン分子量カットオ

40

50

フを有する透析バッグに移す。48時間、3回交換/日で2リットルの4のPBSに対して徹底的に透析する。

【0086】

実施例65 イミダクロプリド免疫原の調製

実施例64の方法論を使用して、実施例21のハプテンを使用してイミダクロプリド免疫原を調製する。

【0087】

実施例66 クロチアジン免疫原の調製

実施例64の方法論を使用して、実施例39のハプテンを使用してクロチアジン免疫原を調製する。

10

【0088】

実施例67 チアクロプリド免疫原の調製

実施例64の方法論を使用して、実施例57のハプテンを使用してクロチアジン免疫原を調製する。

【0089】

実施例68 免疫化スケジュールおよび抗体の収集

最初の免疫化のために、実施例64の免疫原をフロイントの完全アジュバントに溶解する。メスのニューゼーランドホワイトラビットに、およそ25 μ gの免疫原をそれぞれの部位に注射により接種する。同様にヒツジを免疫化し、ただしおよそ38 μ gの免疫原をそれぞれ部位に注射する。

20

次の免疫化で、免疫原をフロイントの不完全アジュバントに溶解する。動物を免疫化の間に4週間休ませ、免疫化の10日後に集血する。追加免疫注射を投与し、そして9月にわたり動物を集血し、それぞれの点で全採血する。

ポリクローナル抗体を当業者に既知の技術を使用して収集する。

【0090】

実施例69 ハプテン - 酵素コンジュゲートの調製

実施例1からのチアメトキサムハプテン(3.1mg)、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)(4.0g)、およびEDC(4.6g)を小さいバイアルにおいて合わせる。これらの材料を穏やかな流れの窒素下で15分間室温で乾燥する。

【0091】

69.2

乾燥ジメチルホルムアミド(2.0mL)を添加し、混合物を1分間超音波処理する。得られた溶液を終夜室温でインキュベーションする。

【0092】

69.3

ホースラディッシュペルオキシダーゼ(8.5mg)を小さいバイアルにおいて、カルボネートバッファー(2.9mL、0.05M pH9.6)中に溶解する。バイアルをアイスバスに置く。

【0093】

69.4

6.2からの全部で100 μ Lのハプテン - NHS - EDC溶液を、ゆっくりと1時間かけて添加し、そして混合物を攪拌しながら2時間インキュベーションする。

反応混合物を、PBS(0.01M、pH7.2)で平衡させたセファデックスG-25Mカラムを通過させる。酵素コンジュゲートを最初3.0mLの溶出液中において収集し、等体積のグリセロールを添加し、-20で貯蔵する。

【0094】

実施例70 チアメトキサムで処理したキャノーラ種子のイムノアッセイ

種子抽出物の一部を、予測された濃度のチアメトキサムがキャリブレーション曲線の範囲内、すなわち0.5ないし120ppbとなるように1% MeOH/H₂Oに希釈する。抗体でコートした管をラベルし、そして管ラックにおき、その結果最初および最後の管

50

が標準であり、そして残りの標準およびサンプルを混ぜる。管ラックはそれぞれの管をつかんでおり、その結果ラックは管を失うことなくひっくり返し得る。アリコート標準またはサンプル(0.5 mL)をすべての対応する管に添加する。酵素コンジュゲート溶液(0.5 mL)をすべての管に添加する。ラックはおだやかに振とうし、すべての管の内容物を混合する。管を室温で20分間インキュベーションする。ラックをひっくり返しすべての管の内容物をデカンテーションさせる。蒸留H₂Oをすべての管に添加し、反転的洗浄ビン(flip-top wash bottle)を使用してオーバーフローさせ、そして洗浄液をデカンテーションする。管をさらに3回洗浄する。最後の洗浄の後、ラックをひっくり返し、そして管を穏やかに清潔なペーパータオルでたたいて過剰の洗浄液を除去する。

【0095】

10

酵素基質(0.5 mL)をすべての管に添加し、これを室温で10分間インキュベーションする。ラックをこのインキュベーション中穏やかに2.5分ごとに振とうする。酸性の停止溶液(1M HCl、0.5 mL)をすべての管に添加し、シグナル発生を終結させる。表10に示されるように、この反応産物の吸光度を450 nmで測定する。標準の吸光度を使用してキャリブレーション曲線、 $Y = mLn(X) + B$ の式の回帰関数を構成する。それぞれのサンプルの吸光度を該関数に代入し、そして希釈したサンプル中のネオニコチノイド農薬の濃度を決定する。得られた濃度に希釈ファクターを乗じてもとのサンプル中のネオニコチノイド農薬の量を算出する。

【0096】

表10 チアメトキサムイムノアッセイのための典型的標準曲線

20

【表10】

¹ チオメトキサムの濃度	450 nmの吸光度 (分析応答)
120	0.3145
20	0.6636
3	1.0283
0.5	1.3618

30

¹ 単位は ppb

【0097】

チアメトキサム標準の応答を記述する関数を回帰分析によって作成する。このデータセットは、 $Y = -.191 Ln(X) + 1.23$ 、 $r = -.999$ の標準曲線をもたらし、ここにY = 分析応答であり、X = チアメトキサム標準の濃度である。

40

【0098】

実施例71 チアメトキサムで処理した作物種子の交差反応性試験

71.1 種子の抽出

処理した種子のサンプルを、50gのワタ、トウモロコシ、ソルガム、スイートコーンおよびコムギまたは40gのキャノーラを、6オンス広口ビンに無作為に加えることによってサブサンプル化する。キャノーラを4回サブサンプル化し、他の種子種類は5サブサンプルを使用する。溶媒(150ml)を添加し、硬くフタをしシールする。ワタ種子は5%アセトニトリル/水で抽出し、一方、他の種子では20%メタノール/水の溶媒系を使用する。ビンを手で30秒間強く振とうし、室温で20分間ウォーターバスに超音波処理しながら置く。サンプルを前記の様に2回およそ5分間振とうする。各ビンの内容物をお

50

よそ5分間据え、アリコート(0.10 ml)を分析のために取る。アリコートを1%メタノール/水に希釈し、標準曲線の範囲に止まるようにする。

【0099】

71.2 イムノアッセイ分析

抗体コートしたポリスチレン培養管をラベルし、そして管ラックに置き、その結果最初および最後の管が標準であり、そして残りの標準およびサンプルを混合する。サンプルおよび標準溶液(0.50 ml)を対応する管に添加する。同じくらいの体積の酵素コンジュゲート溶液を添加する。ラックを穏やかに振とうし、溶液およびセットを混合し、室温で20分間インキュベーションする。すべての管の内容物を、ラックをステンレススチールパンの上でひっくり返すことによって除去する。各管を蒸留水でオーバーフローしながら洗淨する。ラックを流しの上でひっくり返し洗淨水を捨てる。洗淨を4回反復する。次いでラックをひっくり返し、そしてペーパータオルで軽くたたき、残りの洗淨液のほとんどを除去する。(管に残っているいくつかの液体はアッセイの結果に影響を及ぼさない。)酵素基質溶液(0.50 ml)を管に添加し、これを室温で10分間インキュベーションする。ラックを穏やかに2.5分間隔で振とうし、酵素へ基質の十分な供給を維持することを確保する。青色呈色シグナルの発生を酸性停止溶液(0.50 ml)の添加によって終結させる。各管の溶液の吸光度を分光光度計的に450 nmで測定する。

10

【0100】

サンプル中のアナライトの濃度を、 $y = m \ln(x) + b$ の式の回帰関数から決定する。

20

【0101】

71.3 交差反応性決定

イムノアッセイの交差反応性、または特異性を評価し、種子コーティングに見出される他の試験物質がチアメトキサムの測定を妨害するかどうか決定する。試験物質を1%メタノール/水中に1000ないし0.01 ng/mlの範囲の濃度に溶解する。それぞれの濃度のアリコートを前記の様に分析する。この範囲のそれぞれの試験物質の反応性を、Brad y, J. F.; Turner, J.; Skinner, D. H. 'Application of a triasulfuron enzyme immuno assay to the analysis of incurred residues in soil and water sample'. J. Agric. Food Chem. 1995, 43:2542-2547に以前記載されたように決定する。

30

【0102】

71.4 結果

分析した試験物質のなかで、チアメトキサムのみがイムノアッセイに有意に反応性であると思出される(以下の表9)。したがってこのイムノアッセイはチアメトキサムに特異的である。

種子の処理したロットのサブサンプルをイムノアッセイおよびHPLCによって分析した。これらの分析結果を表11に示す。表11は、チアメトキサムについて、40種子サンプルの、ポリクローナル抗体を使用する平均値のイムノアッセイ結果およびHPLC分析の相関を記載する。最良の適合回帰線は、類似の結果がそれぞれの方法によって得られたことを指摘している。

【0103】

40

表9

チアメトキサムのイムノアッセイの交差反応性

試験物質 ¹チアメトキサムに対するパーセント反応性

チアメトキサム	100
クロチアジン	<1.0
イミダクロプリド	² NR
クロルピリフォス	NR
ジフェノコナゾール	NR
フルジオキシニル	NR
ベンタクロロニトロベンゼン	NR
メタラキシル	NR
メフェノキサム (R-メタラキシル)	NR
フルクソフェニウム	NR
カルボキシシン	NR
キャプタン	NR
シスタン (ミクロブタニル)	NR
TCMTB	NR
プリミフォス-メチル	NR
チオファネート-メチル	NR

10

¹パーセンテージとして表されるチアメトキサムの反応性に対する試験物質の反応性

20

²NR、非反応性

【0104】

多くの別形態および修飾形態が、広く記載の本発明の精神または範囲から離れることなく、前記の本発明について作成され得ることが、当業者によって認識される。

【0105】

【表11】

表 11 イムノアッセイによっておよびHPLCによって得られた分析結果の比較

種子の種類	サンプル	見出されるチアマトキサムのPPM					HPLC	
		イムノアッセイ						
		¹ 反復分析					¹ 平均値	
キャノーラ	294642	3517	2586	3403	4139	4327	3594	3724
	294681	4191	3416	3643	3591	4718	3912	3915
	294682	3034	3299	2687	3534	4254	3362	3769
	294683	3264	3104	3614	3860	3445	3457	3875
	294684	2761	3367	3617	3685	3409	3368	3920
ソルガム	294643	1659	1865	1662	1661	1929	1755	1732
	294643	1613	1654	1678	1771	1998	1743	1732
	294685	1348	1855	1601	1984	1979	1753	1853
	294686	1717	2054	1966	1981	1980	1940	1870
	294687	1943	1880	2244	1767	2165	2000	1861
294688	1972	1821	1746	1864	1626	1806	1923	
コムギ	294644	651	664	611	573	612	622	624
	294689	628	688	684	569	741	662	712
	294689	690	732	655	753	710	708	712
	294690	930	817	690	794	898	826	745
	294691	757	565	625	700	806	691	731
294692	1057	994	893	740	845	906	731	
294692	915	861	604	658	599	727	731	

¹ それぞれのサンプルの反復分析を（5反復）を、イムノアッセイによって実施した。それぞれのサンプルについての全てのイムノアッセイ分析の平均値を、回帰分析によって、そのサンプルについてのHPLC結果と比較する。これは以下の回帰関数を導き、それは $Y = 1.00X + 10.9$ 、 $r = .976$ 、 $N = 40$ であり、ここに $Y =$ イムノアッセイによって見出されるPPMチアマトキサム、および $X =$ HPLCによって見出されるPPMチアマトキサムである。

【 0 1 0 6 】

【 表 1 2 】

10

20

30

40

表 11 イムノアッセイによっておよびHPLCによって (cont.) によって得られた分析結果の比較

種子の種類	サンプル	イムノアッセイ 見出されるチアメトキサムのPPM					HPLC		
		1 反復分析						1 平均値	
ワタ	294645	2149	2091	2309	2320	2505	2275	2694	
	294677	2774	2477	2602	3369	3329	2910	2829	
	294678	2220	3587	2945	2870	2853	2895	2907	
	294679	2427	3275	2471	2795	2538	2701	2757	
	294680	1967	2006	2255	2056	2119	2080	2933	
	294680	2963	2750	2510	2934	2481	2728	2933	
	294645	2115	2576	2865	3146	2649	2670	2694	
	スイトコーン	298296	469	428	364	375	455	418	390
		298297	750	390	480	514	499	527	397
		298298	554	--	476	426	481	484	368
	298299	456	440	377	412	387	414	372	
	298300	448	343	375	388	410	393	385	
	298301	3931	3625	4350	4083	4485	4095	3640	
	298302	4854	5058	4558	4286	5237	4798	4189	
	298303	3431	3587	3176	3835	4296	3665	3657	
	298304	5379	5428	4246	4084	3697	4567	3792	
	298305	3107	4301	2881	4397	4692	3876	3859	

1 それぞれのサンプルの反復分析を (5反復) イムノアッセイによって実施した。
 それぞれのサンプルについての全てのイムノアッセイ分析の平均値を、回帰分析によって、そのサンプルについての HPLC 結果と比較した。

【 0 1 0 7 】
 【 冊 1 3 】

表 11 イムノアッセイによっておよびHPLCによって (cont.) 得られた分析結果の比較

種子の種類	サンプル	見出されるチアメトキサムのPPM						
		イムノアッセイ 1 反復分析		HPLC 1 平均値				
トウモロコシ	298307	469	464	567	451	422	475	424
	298308	409	384	409	422	386	402	389
	298309	379	408	368	378	333	373	400
	298310	428	395	493	417	552	367	373
	298311	320	407	307	402	398	457	383
トウモロコシ	298312	3050	3656	2645	3622	3827	3360	3038
	298313	4322	3694	2955	3397	3185	3511	3529
	298314	3602	3347	3804	3055	3972	3556	3681
	298315	3563	3301	3271	3445	4037	3523	3712
	298316	4326	4903	5118	4590	4873	4762	3661

1 それぞれのサンプルの反復分析を (5反復) イムノアッセイによって実施した。
 それぞれのサンプルについてのすべてのイムノアッセイ分析の平均値を、回帰分析によって、
 そのサンプルについてのHPLC結果と比較した。

10

20

30

40

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<i>C 0 7 K</i>	<i>14/76</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 0 7 K</i> 14/76
<i>C 1 2 N</i>	<i>9/08</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> 9/08
<i>C 1 2 N</i>	<i>9/16</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> 9/16 B
<i>C 1 2 N</i>	<i>9/38</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> 9/38
<i>G 0 1 N</i>	<i>21/78</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i> 21/78 Z
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/15</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i> 33/15 C
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/53</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i> 33/53 S
<i>G 0 1 N</i>	<i>33/543</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>G 0 1 N</i> 33/543 5 4 5 Z

(74)代理人 100072730

弁理士 小島 一晃

(74)代理人 100067035

弁理士 岩崎 光隆

(72)発明者 ジェイムズ・フランシス・ブレイディ

アメリカ合衆国 2 7 3 5 8 ノースカロライナ州サマーフィールド、オーク・フォレスト・ドライブ
4 8 0 3 番

(72)発明者 ダナ・フィリップ・シモンズ

アメリカ合衆国 2 7 3 5 8 ノースカロライナ州サマーフィールド、イーグル・ネスト・ドライブ 6
5 0 7 番

(72)発明者 ティモシー・エドワード・ウィルソン

アメリカ合衆国 2 7 3 5 8 ノースカロライナ州サマーフィールド、チャッカー・コート 6 0 1 0 番

審査官 福間 信子

(56)参考文献 特開平 0 6 - 1 8 3 9 1 8 (J P , A)

特開平 1 0 - 2 3 7 0 4 5 (J P , A)

特開平 1 0 - 2 4 8 5 6 5 (J P , A)

特開平 1 0 - 2 5 7 8 8 6 (J P , A)

特開 2 0 0 0 - 1 9 1 6 9 8 (J P , A)

J Agric Food Chem, (2000.07.27), vol.48, p.3378-3382

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00-90

CA/BIOSIS/WPIDS(STN)

PubMed

专利名称(译)	新烟碱杀虫剂的免疫测定		
公开(公告)号	JP4980536B2	公开(公告)日	2012-07-18
申请号	JP2001544026	申请日	2000-12-06
[标]申请(专利权)人(译)	先正达帕蒂乳木果页Schons的股份公司 先正达参股股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	先正达帕蒂乳木果页Schons的股份公司		
当前申请(专利权)人(译)	先正达帕蒂乳木果页Schons的股份公司		
[标]发明人	ジェイムズフランシスブレイデイ ダナフィリップシモンズ ティモシーエドワードウィルソン		
发明人	ジェイムズ・フランシス・ブレイデイ ダナ・フィリップ・シモンズ ティモシー・エドワード・ウィルソン		
IPC分类号	C07K16/44 C07D277/28 C07D401/06 C07D417/06 C07K14/435 C07K14/76 C12N9/08 C12N9/16 C12N9/38 G01N21/78 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/543 C07D213/61 C07D277/32		
CPC分类号	C07D213/61 C07D277/32 C07D401/06 C07D417/06 C07K16/44		
FI分类号	C07K16/44 C07D277/28 C07D401/06 C07D417/06 C07K14/435 C07K14/76 C12N9/08 C12N9/16.B C12N9/38 G01N21/78.Z G01N33/15.C G01N33/53.S G01N33/543.545.Z		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二 小島 一晃		
优先权	09/456782 1999-12-08 US		
其他公开文献	JP2003516423A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于产生抗新烟碱类抗体的免疫原以及通过免疫测定法确定样品中一种或多种新烟碱类杀虫剂的存在抗体，方法，试剂和试剂盒。本发明特别应用于确定应用于植物繁殖材料如种子的新烟碱类杀虫剂的浓度。

