

リレー連載

農薬を変えた農薬～開発ものがたり・日本の創薬力～(5) 殺ダニ剤エトキサゾールの開発－抵抗性との格闘の記録

協友アグリ株式会社 研究所

石田 達也 (いしだ たつや)

はじめに

エトキサゾールは殺ダニ剤「バロックフロアブル」(商品名)の有効成分で1998年4月に農薬登録を取得して販売を開始し、今年(2015年)で18年目の防除シーズンを迎えている。ハダニ類はその増殖能力の高さから、薬剤抵抗性が発達しやすい害虫であり、殺ダニ剤の寿命は短いものが多いが、エトキサゾールは現在でもお茶の分野などで主力剤として使用されている。近年では、米国トウモロコシのハダニ防除剤として広く使用され米国の植物防疫にも貢献している。さらに最近、ナミハダニの抵抗性研究からベンゾイルフェニルウレアを含むキチン合成阻害剤の作用機作解明につながるような発見もなされ(Van Leeuwen et al., 2012)、学問的な貢献にもつながっている。新規有効成分は研究・開発・製造・販売して、はじめて真の価値がわかるものだと実感する。

エトキサゾールは発明段階から抵抗性との格闘に明け暮れてきた。一筋縄でいかなかった開発の経緯をご紹介します。幾度も挫折、諦めそうになったなか、自分を励まし、仲間助けられ、ついに発売にまでこぎつけたエピソードが、新たな創薬に取り組んでいる方々への参考に少しでもなれば、一文を起こす者として望外の喜びである。

I スクリーニング黎明期

協友アグリの前身八洲(やしま)化学は、長らく製剤メーカーとして業界で生きてきたが、自社原体開発が社の存続には不可欠と、1980年より原体開発への歩みを開始した。宇都宮大学の竹松先生は言わずと知れた除草剤の大家で、先生にアイデアとスクリーニング手法の

ご指導を仰ぎ、合成については東京大学の鈴木先生にご指導いただいて、3者共同で創薬体制を作り、TYU(東大のT、八洲のY、宇大のU)というコード番号をつけた化合物の合成とスクリーニングを開始した。TYU化合物は除草剤開発を目的としていたが、殺菌や殺虫の評価も行った。小職は1981年入社で、まさしくスクリーニング体制が始まったばかりの入社であり、研究所配属直後から殺虫剤スクリーニングの一部を担当した。程なく除草剤として評価される化合物がいくつも現れたが、残念ながら開発に足るものはなかった。また、殺虫作用の認められる化合物もあり、日植防委託試験に進めたが、これも開発には至らなかった。TYU化合物から開発剤は生まれなかったものの、合成グループの育成やスクリーニングの考え方等、当社の創薬体制の基礎部分はこの時代に両先生のご指導により形作られた。

当時TYU化合物とは別に合成陣のアイデアによる化合物も評価しており、そういった化合物はYK番号をつけていた。1987年には竹松先生の退官に伴いTYU化合物は一区切りとなり、自社アイデアのYK化合物が中心となったが、生理活性を持つ化合物はそうたやすく見つけられるものではなく、殺虫剤のスクリーニングは毎回評価0、全く効果の認められない状態が続いていた。

II 一筋の光

そんな状態が続いていたころ、小職の1年後輩入社で合成を担当していた鈴木は、天然殺虫成分であるイボテン酸などを参考に殺虫剤目的の合成に取り組んでいた。イボテン酸はベニテングタケなどに含まれる殺虫成分で、その変成物ムッシモール(図-1)はGABAのアゴニストとして神経に作用する。鈴木はムッシモールなどが持つイソオキサゾールの代わりにオキサゾリンを持つ化合物の合成に取り組み、その1号として1987年4月に2-フェニル,4-ベンジルオキサゾリン(YK-800, 図-2)を提供した。この化合物は想定とは異なり、ナミハダニ

The Development of Acaricide etoxazole and the Record of the Grapple with the Resistance. By Tatsuya Ishida (キーワード: エトキサゾール, ヘキシチアゾクス, ベンゾイルフェニルウレア, キチン合成阻害剤, 殺ダニ剤, 抵抗性, ナミハダニ, ミカンハダニ)

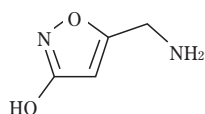


図-1 ムッシモール

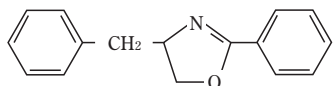


図-2 YK-800

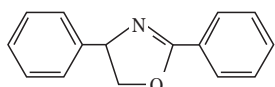


図-3 YK-898

の卵にのみ特異的に活性を示した。それまで「0」行進だった評価表に燦然と輝く「5」の評価。徒労を繰り返す殺虫剤のスクリーニングに一筋の光が差し込んだ瞬間だった。そこからは何とかこの周辺を探索できるよう、少しでも多くの化合物を合成してもらうことが仕事になった。そのためにはまず活性が上昇することが必要だが、ありがたいことに数個目に提供された2,4-ジフェニルオキサゾリン (YK-898, 図-3) が100倍程度一気に活性を上昇させた。

III 合成陣を如何に巻き込むか

YK-800のハダニスクリーニングは2年先輩入社の森川が実施した。森川は1987年8月に本社へ異動となり、その際「ハダニ卵によく効く化合物ができたので後を頼む。」とのことで小職が引継いだ。YK-898はまさしく引継ぎのさなかに提供された化合物だった。

わずか数化合物で一気に活性が上昇したことで小職は「この化合物はいけるのではないか。この化合物にかけよう。」と決意した。当時殺虫剤グループには小職を含め3名が配属されていた。当時のチーフに「スクリーニングが忙しくなるので、専任としてほしい。」と掛け合い、主業務をスクリーニングとしていただいた。今から考えると人手が少ない中、圃場での試験などほとんど行わなくなり、チーフもよく我慢してくれたものだと思う。退路を断ち、後はできるだけ合成数を増やすことに主眼を置き、まずは毎朝合成の居室に顔を出してオキサゾリン化合物が如何に優れているか、ここを掘り起こすのがどれほど有効か、あることないこと吹き込みながら、合成陣を巻き込んでいった。当時、合成グループは4名体制、1か月20化合物程度を合成していた。その大

半はオキサゾリン以外だったが、少しずつオキサゾリン類が増えていき、活性の傾向がおぼろげながらわかり始めた。

IV キチン合成阻害剤？

1970年代、殺虫剤は新たな母核を得ている。昆虫の脱皮を阻害し死に至らしめるベンゾイルフェニルウレア類である。これらは昆虫を含む節足動物のキチン合成を阻害しているとされていた。一方、ハダニ剤では日本曹達がヘキシチアゾクス (商品名：ニッソラン) を開発し、その作用性は卵のふ化阻止、幼虫の脱皮阻害で、ベンゾイルフェニルウレアとは構造が異なるものの、作用性は類似していた。オキサゾリン類の作用性もヘキシチアゾクスと類似しており、いわゆる「キチン合成阻害作用」ではないかと推定された。そういった推定から、ベンゾイルフェニルウレアのベンゼン環上の置換基 (置換位置と種類) を参考にすればオキサゾリン類の活性向上につながるのではと考え、合成陣と相談していくつか合成したところ、図-4のような置換基の組合せで、無置換に比べ格段に活性が上昇することがわかった。そしてこの組合せの中でオキサゾリン1号の合成から10か月後、ついに開発に足る効果を持つ化合物が誕生した。それがYK-1147 (図-5) である。

V 最初の挫折

YK-1147は実圃場レベルでも高い防除効果が認められた。開発部との間で日植防の委託試験に供することも協議され、この化合物で開発を進めるべく様々な準備が始められた。

丁度そのころ、作用性の類似したヘキシチアゾクスが殺ダニ剤の市場を席卷しており、園芸分野の主要ダニ剤となる中、ナミハダニで抵抗性が出現しているとの話が

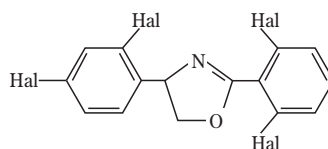


図-4 置換基の組合せ

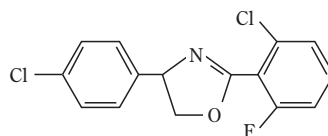


図-5 YK-1147

舞い込んできた。当社の研究所は当時より長野市の郊外にあるが、長野はご承知のようにリンゴなど落葉果樹の生産拠点のひとつであり、殺ダニ剤についても抵抗性が問題になりやすい地域であった。程なく研究所近くのリンゴ園でヘキシチアゾクスが全く効かないという情報が入り、すぐさま採集を行った。YK-1147の効果を確認したところ愕然とする結果となった。想定実用濃度はおろか、1,000 ppm を超える濃度でも全く効かない。開発の方向性は一瞬にして潰えた。

VI 新たな希望の光

またも「0」行進のスクリーニングに戻るのかと思うと暗澹たる気持ちだったが、まだオキサゾリン類に取り組んで一年余り、YK-1147 合成以降ヘキシチアゾクス抵抗性に無効と判るまでも100化合物以上合成されていたので、まずは気を取り直しヘキシチアゾクス抵抗性ナミハダニに対し化合物群の再評価を実施した。すると置換基の種類で活性の強弱が出ることがわかり、そういった結果を元に今一度ヘキシチアゾクス抵抗性ナミハダニに有効な化合物検索に挑戦した。

VII あの光は幻か

ヘキシチアゾクス抵抗性ナミハダニで置換基の検討を行う中で、徐々にではあるが方向性が見えてきた。この方向に行けばヘキシチアゾクス抵抗性は打破できると確信が持てた。そしてついにヘキシチアゾクス抵抗性ナミハダニに問題なく効く化合物群が見つかった。これで開発の方向性は決まったと思われた矢先、ヘキシチアゾクス抵抗性ミカンハダニが問題化し、同じ轍は踏むまいと抵抗性ミカンハダニを入手した。明るかった光は見る見るうちに消えていった。ヘキシチアゾクス抵抗性は打破されたのではなかったのか。残念ながらミカンハダニでは有効ではなかった。

しかしここで諦めるわけにはいかないと、合成陣を鼓舞し続け、打開策はないか探り始めたが今回の壁は厚かった。オキサゾリンリード化合物の発明者で、合成牽引役でもあった鈴木も「石田さんもう止めよう・・・」と諦めの言葉を口にした。

新たに始まる化合物が有効である保証などない。言ってみれば失職の危機である。必死の思いで抵抗性ミカンハダニでの再検索を続行した。もう後戻りなどできないところまで小職は追い込まれていた。

VIII 窮すれば通ず

このとき諦めていたら果たしてエトキサゾールは生ま

れていたのだろうか。ヘキシチアゾクスの抵抗性機構は明確ではなかったものの、ナミハダニもミカンハダニも非常に高度で濃度反応は見られず、作用点変異が疑われた。根拠は全くないものの、何となく「ナミハダニで打開できたんだから、ミカンハダニでもできるんじゃないか。」というある種楽観的な見方も持っていた。いや、そうでも思わないと立ち上がるのも困難な状況だった。

半年近く厳しい状況が続いたころ、アルキル置換に可能性が見え始めた。ナミハダニだけでなくミカンハダニの抵抗性にも活性が出始めた。そこから劇的に状況が変わり始め、面白いように活性の高い化合物が出てくる。どこまで活性が高まるのか、逆に予測できないような状況で、つい一年前までの打ちひしがれていた状態が嘘のようだった。

IX エトキサゾールの選定

アルキル置換を中心に続々と高活性の化合物が合成され、殺虫剤グループはうれい悲鳴を上げていた。このころオキサゾリン類はハダニだけではなくチョウ目やアブラムシ類と幅広い殺虫活性を持つこともわかり、グループは人手が足りず、本社から森川が戦線復帰した。だが、さてこの中からどう選抜するのかは大きな課題だった。ラボでの基礎活性で大差ないものが十指にあまるほどあった。まず選抜されたのは長鎖アルキルを持ったもので、YI-5201 というコードで日植防委託試験に供された。これで開発には十分だろうと考えていたが、残効性にやや不安を持っていた。そんな不安を抱えながらさらに周辺探索を続けていると、4-フェニルのオルト位にアルコキシを導入するとパラ位置換基の活性に影響することがわかった。YI-5201 が合成されてから1年以上かかり1990年7月に後年エトキサゾールと命名される化合物(YK-2084, 図-6)が生まれた。エトキサゾールはYI-5301のコードで日植防委託試験に供されることになった。

さてここで最終的な開発候補を選択しなければならぬ。研究所が長野にあったことから、落葉果樹での試験は十分にできたが、カンキツでの試験が不足していた。そこで静岡県柑橘試験場の古橋先生を訪ね圃場の一角を

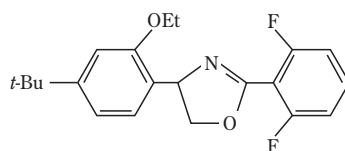


図-6 YI-5301 (YK-2084)

お借りできないかお願いしたところ快諾いただいた。そこから毎週長野・静岡間の往復が始まった。当時はまだ北陸新幹線がない時代、往復に10時間以上かかる行程を繰り返し、YI-5201, 5301とさらに複数化合物の圃場試験を実施した。結果は明白だった。1992年秋、研究所と開発部で最終選択の会議を開き、殺虫剤グループは自信を持ってYI-5301の開発を提案した。

X 上市直前の落とし穴

開発の決断をしてからの動きには、少なくとも大きなトラブルはなかった。合成法は当時の大日本インキが画期的な方法を発明し、比較的安価に製造できるようになった。合成法が決まり、原体スペックが決まらなると毒性試験に入れないが、この部分が比較的スムーズだったため、毒性試験へ速やかに移行できた。毒性試験も順調に進み、1996年に農水省へ登録申請を行った。

小職は登録申請を行った96年にエトキサゾールの普及を行うため本社へ異動となった。上市は秒読みとなり、普及用の資料作りに追われる日々が続いた。当社がかつてダニ剤を扱ったことはあるものの、ほとんど未経験と言ってよかったため、まずダニ剤とはどういうものかを研究所時代から営業向けに資料を作り啓発活動をしていた。本社に移ってからはさらに社外向けの普及資料やQ&A、クレーム対応マニュアルなど、想定される様々なトラブルにも対処できるよう準備を進めた。

翌年に登録の目処が立った1997年、果樹や茶の大産地を抱える各県の試験場訪問を行っていた。当時、ダニ剤はピリダベンやフェンピロキシメート等が主流となっていたが、すでに各地で抵抗性が問題となっており、実質的に有効な剤がほとんどない状況だった。幸いエトキサゾールはそういった抵抗性にも卓効を示し、各県の指導者から待ち望まれる薬剤となっていた。そんな夏のある日リンゴの大産地青森県の林檎試験場を訪ね、翌年の上市に向けてお願いをしようとした矢先、目の前が真っ暗になるような事実が告げられた。試験場では県内各地からナミハダニを集めて感受性検定を実施していた。翌年にエトキサゾールの登録が見込まれていたことから供試薬剤に加えたところ、相馬村紙漉沢のリンゴ圃場から得られたナミハダニに対して全く効果がなかったとのことだった。すぐさまそのハダニを分譲いただき研究所で検討した。

農業、とりわけ殺ダニ剤は抵抗性の問題に常に悩まされているが、発売前に公的機関から指摘を受けることはまれだと思われる。致命的な問題点をリンゴという大きなマーケットのその最大県の試験場から突きつけられた

のだから深刻さの度合いが違った。社内検討でも効果は認められず、発売前から抵抗性問題を突きつけられる形となった。

社内は大騒ぎとなり、対応策が協議された。当社は全農を通じてのみ販売を行っている系統メーカーである。全農との協議に入り、問題のナミハダニがまん延しているのか否か、作用性の似たヘキシチアゾクスとの交差関係など、発売前にできるだけことは調べようと、全農の全面的な協力を得て、全農農業技術センターの方々現地調査を行った。その結果、最初に発見された圃場とそのごく周辺にしか抵抗性ナミハダニは分布しておらず、またヘキシチアゾクスとの交差関係も認められなかった。同地区ではエトキサゾールの試験すら行ったことのない、いわばエトキサゾール処女地であったため、なぜそのような高度抵抗性個体群が分布しているのか謎だった。青森県としても、有効なダニ剤が少ない状況で、全農との調査結果を尊重し、注意喚起にとどめ県の指導剤に加えていただいた。

ただ、そういったナミハダニが存在するという厳しい現実を突きつけられ、販売後のクレームが懸念された。

XI クレームの嵐

懸念したことが現実となった。1998年4月に農業登録を取得しエトキサゾールは晴れてバロックフロアブルとして世の中に出たが、早速長野県飯田地区で効果問題のクレームがでた。これはごく一部であったため大事にはならなかったが、翌1999年嵐が吹き荒れた。

前年のクレームのあった長野県飯田地区では各地で効果問題が発生した。また、秋田県横手市の平鹿地区は殺ダニ剤が一年と持たないといわれるほど抵抗性の深刻な地区で、バロックの効果は最初から心配されていたが、発売初年目の効果は目を見張るものがあり、バロック散布以降、年内はハダニが発生しなかった。2年目、毎々すぐに抵抗性に悩まされていた農家は同地区にある秋田県果樹試験場へ大丈夫かと相談した。試験場では防除直前の6月にリンゴ園からナミハダニを集めバロックの感受性を調べたところ、10万倍希釈でも高い効果が認められたため、農家に安心して使ってよいとの指導を行っていただいた。梅雨が明けナミハダニの防除シーズンとなった。バロック散布後の圃場でナミハダニが猛威を振るった。その秋試験場から呼び出されなぜかと問われたが答えるすべがなかった。ただ、今考えると原因は恐らく「こうだろう」と推定できる。

XII エトキサゾール抵抗性研究の系譜

青森県相馬村で抵抗性ナミハダニが見つかり、その性質を全農農業技術センターで調査いただいた。エトキサゾールの抵抗性は完全劣性の単一主導遺伝子によるものと推定された(小林ら, 2001)。

その後、京都大学の刑部先生らがエトキサゾールとヘキシチアゾクスのナミハダニ抵抗性遺伝子について体系的に検討され、ヘキシチアゾクス抵抗性遺伝子は複数あり、そのうちの 하나가エトキサゾール抵抗性遺伝子と強く連鎖するか同一の可能性があると発表された(Asahara et al., 2008)。

ミカンハダニではナミハダニのような急激な感受性低下、高度抵抗性出現が起こらなかったが、発売直後はバロックを散布すると年明けまでミカンハダニが見られない、という農家の感想が、徐々に残効性が短くなる見立てとなり、当初のような効果ではないという声が発売3, 4年目あたりから増えてきた。そのころクレームのあった圃場からミカンハダニを採集しエトキサゾールの活性を検査すると、感受性系統の十分の一から数十分の一に活性が低下していた。こういったミカンハダニを元に全農農業技術センターではナミハダニと同様に淘汰と逆淘汰を行って抵抗性の遺伝様式の解明に着手した。ところが、飼育自体がうまくいかない。当社の研究所でも飼育を試みるがうまく増えてくれないということが何度もあり、エトキサゾールに感受性の低下したミカンハダニは増えにくいのではないかと、という可能性が示唆された。

この問題に果敢に挑んだのが研究所で殺虫剤の担当だった太田(故人)である。太田は2005年に静岡から鹿児島まで、主要な柑橘栽培地帯の20地点からミカンハダニを集め、各々のLC50値と、増えやすさの指標である内的自然増加率を、各地の50から100個体前後を個別飼育して求めたところ、LC50値と内的自然増加率に負相関性があることを見いだした。この結果は2006年の応用動物昆虫学会つくば大会にて口頭発表した。エトキサゾール抵抗性ミカンハダニは感受性に比べ増殖能力が劣るという結果で、こういった性質によりミカンハダニではエトキサゾールの感受性低下が緩やかに進行し、使用を中断すれば感受性の回復が期待できるのではないかとこの可能性にも言及している。この研究を踏まえ、一度感受性低下問題でJAの暦から削除された地区で感受性モニタリングを元に有効な殺ダニ剤が少ない中、バロック再入暦の提案をJAに行っている。

2012年欧米のグループが画期的な研究を発表した。冒頭述べたVan LEEUWENたちの論文だ。彼らはナミハダ

ニのエトキサゾールに対する抵抗性の本体に迫った。詳細なゲノム分析から、キチン合成酵素のたった一つのアミノ酸変異が抵抗性と密接に関連していることを突き止めた。いわゆる「作用点変異」による抵抗性ということだ。作用点変異はよく鍵と鍵穴の関係にたとえられる。鍵穴の形が変わり、鍵が使えなくなるということだが、今回のアミノ酸変異はさてどうなんだろう。確かに抵抗性のもは変異があり、感受性のものにはない。この関係は対応している。したがって変異が抵抗性に関係していることは間違いのないと思われる。このアミノ酸変異がどのようなメカニズムで抵抗性と関係しているのか、それがわかって初めて抵抗性が解明できたといえるのだと思うが、これまでとは全く違う世界が開けたことに間違いはない。ここから道のりは長いものの、作用機作解明にまでつながることを期待している。

そんなさなか、昨年7月に中国の研究者がミカンハダニのキチン合成酵素のシーケンスをデータベース上に公開した。それを元に現在、京都大学の刑部先生とともにミカンハダニのエトキサゾール抵抗性について研究を始めている。ミカンハダニの抵抗性には不思議な特性があるようだ。先に述べた太田の研究内容もそうだが、それだけでは説明しきれない現象もあり、抵抗性が複数の要因が絡み合って複雑な成り立ちをしているのではないかと考えられる。詳細は現在研究中なので伏せざるを得ないが、これまでにやられてこなかったような抵抗性の研究になるかもしれない。

エピローグ —Da Capo—

我々はヘキシチアゾクス抵抗性の克服を目的にエトキサゾール(商品名:バロックフロアブル)の開発・上市に至ったが、現場では想定を超えた現象が起こっており、抵抗性発達も含めた、そのメカニズムは現在研究中であり、解明の道も開けてきているように思える。上市18年目を迎えたエトキサゾールはお茶のほか、海外では果樹に加えトウモロコシでも広く使われはじめ、今でも国内外の植物防疫に大きく貢献している。有効なダニ剤が少ない中、抵抗性のメカニズムが解明されることで、抵抗性発達リスクが回避出来、少しでも長く、エトキサゾールが世界の植物防疫の一助になることを強く望み、筆を置きたい。

引用文献

- 1) Asahara, M. et al. (2008): J. Ecom. Entomol. 101: 1704 ~ 1710.
- 2) 小林政信ら (2001): 応動昆 45: 83 ~ 88.
- 3) Van LEEUWEN, T. et al. (2012): Proc Natl Acad Sci U S A. 109(12): 4407 ~ 4412.