学会賞受賞論文

(業績賞)

殺菌剤イプロナゾールおよびメトコナゾールの開発

熊 沢 智, 伊 藤 篤 史, 最勝寺俊英[†], 中 馬 寛^{††}

呉羽化学工業株式会社錦総合研究所

[†]呉羽化学工業株式会社合樹・化学品事業部化学品開発部^{††}徳島大学薬学部

Development of New Fungicides, Iproconazole and Metconazole

Satoru KUMAZAWA, Atsushi ITO, Toshihide SAISHOJI[†] and Hiroshi CHUMAN^{††}*Nishiki Research Laboratory, Kureha Chemical Industry Company, Ltd.,
16 Ochiai, Nishiki-machi, Iwaki, Fukushima 974-8686, Japan**[†]Chemicals and Agrochemicals Development Department,
Kureha Chemical Industry Company, Ltd., 1-9-11, Nihonbashi Horidome-cho,
Chuo-ku, Tokyo 103-8522, Japan**^{††}Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokushima,
1-78 Shomachi, Tokushima 770-8505, Japan*

はじめに

世界人口の急激な増加が予想される状況下で、食糧確保の為に農業の生産性向上は従来にも増して重要な問題となってきた。農業生産における農薬の重要性はここで述べるまでもなく、農業は全世界で広範囲に利用されている。その一方で、1) 環境への影響を軽減させるための低薬量化、低毒性化への要求、2) 薬剤耐性菌の進展、などにより、さらに理想的な薬剤の創製が望まれている。

1980年代前半には、当時最も研究の盛んであったアゾール系殺菌剤の中でも、一部に上記の問題が表面化しつつあった。筆者らは、独創的で、高性能の薬剤によってこれらの問題を解決すべく、合成手法と計算化学的手法を駆使し、新規アゾール系殺菌剤の探索研究に着手した。本稿では、イプロナゾールとメトコナゾール (Fig. 1) の研究の経緯などについてその概要を紹介する。

研究の経緯

1. 背景と目標

アゾール系殺菌剤は、抗菌スペクトルの広さと優れた浸透移行性により農業分野では、不可欠の一群になっている。また植物病原菌の菌体膜構成成分であるエルゴステロール生合成の C-14 脱メチル化酵素チトクローム P450_{14DM} を阻

害する農薬として知られている。本系統化合物の開発研究は世界中の研究者が活発に手がけてきており、今までに 25 種以上の同系統薬剤が農業市場に参入している^{1,2)}。

筆者らは、新規骨格のアゾール系殺菌剤を創製するにあたって、薬物と受容体の相互作用様式を想定し、既知アゾール系殺菌剤の構造と活性の相関を新たな視点から考え分子設計を行った。

2. 分子設計の発想

アゾール系殺菌剤の多くは、化学構造の特徴としてアゾール環とベンゼン環を持っている。さらに、水酸基を有する場合が多い。アゾール環とベンゼン環を結ぶ結合数の違いからアゾール系殺菌剤を分類した場合、それらの多くは、2 結合タイプか 3 結合タイプに分類される (Fig. 2)。既知アゾール系殺菌剤の構造を 3 次元的視点で見ると、活性発現に必須と考えられるアゾール環とベンゼン環は、親油的な基を介して互いに逆方向に位置していることに着目した。もし、アゾール環とベンゼン環が Fig. 3 に模式的に示したように、それぞれの芳香環に対応するチトクローム P450_{14DM} の相互作用部位に適合するならば、高活性が期待できると考えた。

芳香環間の距離を制限するために親油性基 (母核) として環状構造 (Fig. 3 の A 部分) を設定した。環状構造とし

Fig. 1 Chemical structures of ipconazole and metconazole.

Two-bond type :

Three-bond type :

Fig. 2 Typical azole type fungicides for agricultural use.

Fig. 3 Hypothetical binding model of our conceptional lead molecule to the target enzyme cytochrome P450_{14DM}.

て具体的にはシクロペンタン環を選定した。この理由はシクロペンタン環の配座がシクロヘキサン環などに比較して柔軟であるために、環構造によって制限された芳香環間の距離に一定の許容範囲を与えることによる。さらに、シクロペンタン環とアゾール環およびベンゼン環の間に炭素を一つずつ挿入した。これにより、シクロペンタン環の効果に加えて、芳香環間の距離と配向の自由度を大きくし、対応する相互作用部位への二つの芳香環の微妙な適合の可能性を高められると考えた。また他のアゾール系殺菌剤の構造との比較から、水酸基をアゾリルメチル基と同位置へ導入した³⁻⁶⁾。

以上のような発想の下で、アゾール環とベンゼン環を5

本の結合で結び、その間にシクロペンタン環を配するというユニークな構造のアゾール系シクロペンタノール誘導体 type I を設計し、Fig. 4 に示した方法で合成した⁷⁾。

3. リード化合物の発見と定量的構造活性相関解析

type I の殺菌活性を評価した結果、ムギ類のさび病、うどんこ病、イネばか苗病、ならびに灰色かび病に対して高い活性を示し、抗菌スペクトルの広い化合物群であることが明かとなった。これら誘導体の灰色かび病菌のステロール生合成への影響を調べたところ、顕著なエルゴステロールの減少と24-メチレンジヒドロラノステロールの蓄積が認められ、想定どおりエルゴステロール生合成経路のC-14脱メチル化を阻害する剤であることが確認された。type I の構造と活性を検討したところ、水酸基とベンジル基の相対配置に関しては、シス型がトランス型より活性が高いことがわかった。また、アゾール基に関しては、*in vivo* 試験ではトリアゾール基置換体が、イミダゾール基置換体よりも活性が高かったため、以後すべてトリアゾール基置換体の活性を評価した。type I の構造と *in vitro* 試験における灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* とイネばか苗病菌 *Gibberella fujikuroi* に対する殺菌活性の相関について、物理化学的パラメータおよび置換ベンゼン環上の立体形状パラメータを用いて Hansch-Fujita 法による定量的構造活性相関解析を行い式 (1), (2) を得た。ベンゼン環の立体形状パラメータについては、ベンゼン環の中心を原点とし、結合軸方向に X 軸をとり、それと垂直方向に Y 軸をとった。置換ベンゼン環の Y 軸方向の長さを W とし、原点から *meta*-, *para*-位置換基までの X 軸方向の長さを L_1 , 原点から *ortho*-位置換基までの X 軸方向の長さを L_2 とした。Z 軸方向の置換ベンゼン環の厚みを D とした³⁾(Fig. 5)。

pIC_{50} (*Botrytis cinerea* *in vitro*)

$$= -1.309L_2 - 0.843W - 0.716D + 4.023 \log P \\ - 0.541 (\log P)^2 + 10.068$$

$$(n=18, r=0.952, s=0.282, \log P_{opt}=3.71) \quad (1)$$

pIC_{50} (*Gibberella fujikuroi* *in vitro*)

$$= -0.833L_2 - 0.711W - 0.435D + 2.896 \log P \\ - 0.356 (\log P)^2 + 8.735$$

$$(n=16, r=0.938, s=0.237, \log P_{opt}=4.07) \quad (2)$$

ここでは、 pIC_{50} は菌糸伸長を50%阻害するモル濃度(mol/l)の逆数の対数値、 n は化合物数、 r は相関係数、 s は標準偏差を表す。

活性は、化合物の親疎水性尺度 $\log P$ 値に依存し、その最適値は、灰色かび病菌で3.71、イネばか苗病菌で4.07であることが示された。また式 (1), (2) 共に L_2 , W , D の各係数が負であることは、ベンゼン環の *para*-位以外に置

Fig. 4 Synthetic scheme for azolymethylcyclopentanols (type I, II).

換基が存在したり、かさ高い置換基があると活性が低下することを示している。なお、統計的に Hammett σ などの電子のパラメータの有意性は認められなかった。

次に、*in vivo* 試験におけるキュウリを用いた灰色かび病に対する殺菌活性について解析して、式(3)を得た。

$$\begin{aligned} \text{pIC}_{50} (\text{Botrytis cinerea in vivo}) \\ = -1.090W + 5.781 \log P - 1.008 (\log P)^2 + 2.624 \\ (n=18, r=0.854, s=0.425, \log P_{\text{opt}}=2.87) \quad (3) \end{aligned}$$

$\log P$ の最適値は 2.87 であり、*in vitro* 試験の結果と比べると 0.8 低い値である。これは化合物の植物体への浸透移行性に関係していると考えている。 W の係数が負であることより *in vitro* 試験の場合と同様に、ベンゼン環の *para*-位以外に置換基が存在すれば活性が低下することが示された。type I の中で市販アゾール剤と同等の高活性を有する *para*-Cl 体 (KNF-508) をリード化合物として選択した。

4. メトコナゾールの発見

リード化合物 KNF-508 の活性をさらに上げるため、以下に述べる物理化学的な検討を行った。type I の構造活性相関式 (1), (2) から最適 $\log P$ 値が 3.7~4.0 付近にあり、他社の幾つかのアゾール系殺菌剤の $\log P$ 値は 3.1~4.5 の範囲 (平均値 4.0) であること、分子容 (van der Waals 体積) の平均値は $280 \text{ \AA}^3$ であること、一方 KNF-508 のそれぞれの値は 3.11, $260 \text{ \AA}^3$ であることを考慮して、KNF-508 に上記の条件を満たすようなアルキル基を導入することを検討した^{3,4)}。構造活性相関式(1), (2)より、*ortho*-、*meta*-位への置換基導入や、*para*-位へのかさ高い置換基導入は、

Fig. 5 Steric parameters for substituted phenyl moiety.

Fig. 6 Molecular design of metconazole from lead compound KNF-508.

活性を低下させることから、アルキル基の導入はシクロペンタン環上が望ましいと考えた。導入位置として、KNF-508 の合成中間体を利用できるアゾリルメチル隣接位 (シクロペンタン環 5 位) を選び、化合物 type II の合成に着手すると同時にその 3 次元立体構造を他社の幾つかのアゾー

Fig. 7 Three-dimensional shape comparison of (-)-(1*S*, 5*R*)-metconazole (left) and (-)-(R)-diniconazole (right).

Table 1 Fungicidal activity of stereoisomers of KNF-508 (lead compound) and metconazole *in vitro*.

Compound	EC ₉₀ (mg/l) ^{a)}	
	<i>B.c.</i>	<i>G.f.</i> ^{b)}
KNF-508 <i>cis</i>	0.9	2.1
KNF-508 <i>trans</i>	32.1	152
metconazole <i>cis</i>	0.2	0.2
metconazole <i>trans</i>	1.8	2.0
(+)-metconazole <i>cis</i>	10.0	20.0
(-)-metconazole <i>cis</i>	0.1	<0.1

^{a)} Effective concentration of 90% inhibition of mycelial growth. ^{b)} *B.c.*: *Botrytis cinerea*, *G.f.*: *Gibberella fujikuroi*.

ル系殺菌剤の立体構造と比較検討した(Fig.6). type II の化合物は, type I と同様な方法で調達した⁸⁾(Fig. 4).

他社アゾール剤との3次元立体構造比較の一例としてジニコナゾール⁹⁾(住友化学)との比較結果をFig. 7に示す. ジニコナゾール活性配置体 (-)-(R)-体とリード化合物KNF-508のシクロペンタン環5位にジメチル基を導入し, 後にメトコナゾールと命名した化合物とを解析した結果, それぞれの分子のアゾール環, ベンゼン環との間の結合数が異なる(メトコナゾール=5, ジニコナゾール=3)にもかかわらず, 全体的にも, また導入したジメチル基がジニコナゾールの t -ブチル基部分に良好に対応することが分かった. この結果はKNF-508のシクロペンタン環5位に導入したアルキル基部分が単に疎水性, 分子容の増大からの寄与のみならず, 受容体の活性部位へ直接的に作用し殺菌活性向上に関与することを示している. メトコナゾールを含む幾つかのtype IIの合成が完了し, それらの殺菌活性を測定した結果, type IIはtype Iに比較して大幅な活性上昇を示した. また, メトコナゾールの光学活性体については, (-)-体が(+)-体に比べはるかに高い活性を示した(Table 1). この結果はジニコナゾールとの立体構造比較から予想したアルキル基の活性への寄与とともにメトコナ

ゾールの予測活性絶対立体配置 (-)-(1*S*, 5*R*) が正しかったことを意味する.

type II化合物群の大幅な殺菌活性向上を確認した後, アルキル基の殺菌活性に対する効果を再度Hansch-Fujita法を用いて解析した. type Iの解析に用いたパラメータに加え, シクロペンタン環上のアルキル基(R^1, R^2)の有無を表すindicator variable I ($R^1=R^2=H$ の場合 $I=0$, その他の場合 $I=1$)を導入し, type Iにtype IIを加えた化合物群についての解析を行い, 次式(4), (5)を得た.

$$\begin{aligned} \text{pIC}_{50}(\text{Botrytis cinerea in vitro, type I+type II}) \\ = -0.761L_2 - 0.862W - 0.669D + 3.237 \log P \\ - 0.418(\log P)^2 + 0.428I + 9.782 \\ (n=32, r=0.933, s=0.377, \log P_{\text{opt}}=3.87) \end{aligned} \quad (4)$$

$$\begin{aligned} \text{pIC}_{50}(\text{Gibberella fujikuroi in vitro, type I+type II}) \\ = -0.790W - 0.270D + 3.350 \log P \\ - 0.471(\log P)^2 + 1.012I + 6.14 \\ (n=30, r=0.966, s=0.245, \log P_{\text{opt}}=3.56) \end{aligned} \quad (5)$$

式(4), (5)は, type Iのそれぞれに対応する式(1), (2)と比較して, 各説明変数の係数の符号, 大きさが類似していた. また, indicator variable I が統計的に有意であることは, アルキル基が活性上昇に大きく寄与していることを表している.

3次元立体構造の比較検討ならびにHansch-Fujita法によって得られた結果はともにシクロペンタン環上のアルキル基が標的酵素チトクロームP450_{14MD}との相互作用において重要な相互作用部位であることを示唆している. この研究の間に筆者らの開発した新規な3次元構造活性相関解析法Voronoi Field Analysisによっても, このアルキル基がチトクロームP450_{14DM}との疎水性相互作用部位であることが示された¹⁰⁾.

Fig. 8 Correlation of fungicidal activity with carbon number of 5-monoalkylazolylmethylcyclopentanols.

Fig. 9 Plant growth regulatory activity of 5-monoalkylazolylmethylcyclopentanols on wheat.

Wheat seeds were soaked in the suspension containing 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of each test compound for 24 hr and grown in greenhouse for 3 weeks.

Fig. 10 Structures of ipconazole and its stereoisomers.

a) The first *c*(*cis*) or *t*(*trans*) indicates the configuration with respect to the hydroxy group and the benzyl group, and the second *c*(*cis*) or *t*(*trans*) indicates the configuration with respect to the hydroxy group and alkyl substitution on the cyclopentane ring.

5. 5員環のジメチル位置異性体の構造と活性

活性向上に大きく寄与するメトコナゾールのシクロペンタン環2位のジメチル基が、最適な置換位置であるかを調べるために、ジメチル基を3または4位に置換させた化合物を合成し殺菌活性を評価した。その結果、2位のジメチル基置換体であるメトコナゾールは、3または4位置換体と比較してはるかに高い活性を有しており、ジメチル基の位置としては最適であることが改めて確認された¹¹⁾。

Fig. 11 Schematic diagram illustrating the binding of (-)-(1*S*, 5*R*)-metconazole to cytochrome P450_{14DM}.

6. シクロアルカン誘導体の構造と活性

母核の環構造としてシクロペンタン環を採用したが、シクロヘキサン環やシクロヘプタン環母核の化合物はどの程

度の殺菌活性を有しているのか興味を持たれた。メトコナゾールのシクロペンタン環部をシクロヘキサン環、シクロヘプタン環に置き換えた化合物を合成し殺菌活性を調べた。シクロヘプタン誘導体は、メトコナゾールより低下し、シクロヘキサン誘導体は更に低下した。シクロアルカノール誘導体のベンゼン環とトリアゾール環の空間配置を配座解析をした結果、シクロアルカノール誘導体間で異なっていることが示された¹²⁾。

7. イブコナゾールの発見

リード化合物 KNF-508 のシクロペンタン環 5 位へのアルキル基導入が、殺菌活性を大きく左右することが示唆されたために、さらに炭素数の異なるモノアルキル基を導入し、構造と活性の関係をさらに検討した。その結果、アルキル炭素数と殺菌活性との間に Fig. 8 に示したような関係が見られ、炭素数が 2 個～3 個の場合に、高い殺菌活性を示すことが分かった^{4,11)}。さらに、アゾール剤特有の植物生長調節作用（矮化作用）を調べた結果、モノメチル置換体は無置換体よりも強い矮化作用を示したが、エチル置換体、イソプロピル置換体、*n*-プロピル置換体など、アルキル炭素数が 2 個以上の誘導体からは、その矮化作用は劇的に消失した^{11,13)} (Fig. 9)。また、ジメチル置換体であるメトコナゾールの矮化作用はモノメチル置換体と同等であり、同じ炭素数のエチル置換体の作用よりもはるかに強いことから、植物の矮化作用はこの部位のアルキル鎖の長さが大きく影響していることが明かとなった。

イブコナゾールの有効成分は、二つの幾何異性体であるイブコナゾール cc とイブコナゾール ct から成り立っている (c と t の意味は Fig. 10 に記載)。その他に 2 種の幾何異性体イブコナゾール tc とイブコナゾール tt がある。有効成分の 2 種とイブコナゾール tt の殺菌活性はほぼ同等であったが、イブコナゾール tc の活性は劣った¹⁴⁾ (Table 2)。

これらモノアルキル誘導体と合成した全てのシクロペンタノール誘導体の中から実用性評価を進めた結果、イブコナゾールはイネばか苗病、イネいもち病、イネごま葉枯病

に優れた効果を示したことから、イネ種子消毒剤として開発が進められた。また、メトコナゾールは欧州のムギ病害を対象とする殺菌剤として選抜された。

8. チトクローム P450_{14DM} との相互作用様式

メトコナゾールとイブコナゾールの発見の過程で合成された誘導体の構造活性相関解析と 3 次元立体構造解析から、それらの受容体であるチトクローム P450_{14DM} との相互作用様式を考察した。その推定相互作用様式の模式図を Fig. 11 に示した。1) トリアゾール環は P450_{14DM} のヘム鉄へ配位する。2) ベンゼン環は疎水性相互作用部位と推定され、*para*-位にかさ高さの小さい置換基が活性に有利。3) シクロペンタン環上の 2 位のアルキル基はもう一つの疎水性相互作用部位と推定され、アルキル基の炭素数 2 個～3 個の場合が最適と考えられる。4) 水酸基は特定の位置での水素結合あるいは静電相互作用部位と推定される^{3,4,11,15)}。

工 業 化

イブコナゾールとメトコナゾールは、Fig. 4 に示した中間体ケトン (4) から、オキシラン化、アゾール化を経るルートによって製造される^{8,16)}。オキシラン化工程にジメチルスルホキシニウムメチリド (イリド) を使用することにより、両剤ともに、より高活性なベンジル基がシス型の異性体が優先的に得られる。イリドの原料である Corey 試薬は、経済性のあるトリメチルスルホキシニウムプロミドの商用プロセスを確立し、イブコナゾールとメトコナゾールの製造を支えている。

名称および性状¹⁷⁾

一般名：イブコナゾール (ipconazole)、商品名：テクリート®、化学名 (IUPAC)：(1*RS*, 2*SR*, 5*RS*; 1*RS*, 2*SR*, 5*SR*)-2-(4-chlorobenzyl)-5-isopropyl-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)cyclopentanol、分子式：C₁₈H₂₄ClN₃O、外観：白色結晶、融点：88-90°C、分配係数： $P_{ow}=1.76 \times 10^4$ (log $P=4.24$)、水溶解度：6.93 mg/l (20°C)

一般名：メトコナゾール (metconazole)、商品名：CAR-AMBA®、化学名 (IUPAC)：(1*RS*, 5*RS*; 1*RS*, 5*SR*)-5-(4-chlorobenzyl)-2,2-dimethyl-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)cyclopentanol、分子式：C₁₇H₂₂ClN₃O、外観：白色結晶、融点：110-113°C、分配係数： $P_{ow}=7.08 \times 10^3$ (log $P=3.85$)、水溶解度：15 mg/l (20°C)

生 物 活 性

1. 基礎活性

イブコナゾールおよびメトコナゾールは子囊菌類、担子菌類、不完全菌類の中の多くの菌類に高い殺菌活性を示し、特に、*Gibberella*, *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Alternaria*,

Table 2 Fungicidal activity of ipconazole racemic diastereomers *in vitro*.

Compound	EC ₅₀ (mg/l) ^{a)}		
	<i>G.f.</i>	<i>C.m.</i>	<i>P.o.</i> ^{b)}
ipconazole cc	0.05	0.4	0.08
ipconazole ct	0.06	0.4	0.03
ipconazole tc	0.9	1	0.5
ipconazole tt	0.09	0.5	0.04

^{a)} The effective concentration of 50% inhibition of mycelial growth value on the PSA after incubation for 3 days at 28 °C. ^{b)} *G.f.*: *Gibberella fujikuroi*, *C.m.*: *Cochliobolus miyabeanus*, *P.o.*: *Pyricularia oryzae*.

Table 3 Fungicidal activity of ipconazole and metconazole.

Test fungi	MIC(mg/l) ^{a)}	
	Ipconazole	Metconazole
Ascomycotina		
<i>Cochliobolus miyabeanus</i>	50	25
<i>Gibberella fujikuroi</i>	0.5	0.5
<i>Gibberella zeae</i>	1.6	3.1
<i>Glomerella cingulata</i>	1.6	1.6
<i>Leptosphaeria nodorum</i>	0.8	0.8
<i>Monilinia mali</i>	0.02	0.05
<i>Pyrenophora graminea</i>	13	13
<i>Sclerotinia cinerea</i>	0.05	0.1
<i>Valsa ceratosperma</i>	0.1	0.2
Basidiomycotina		
<i>Corticium rolsfii</i>	1.6	6.3
<i>Ustilago nuda</i>	3.1	6.3
Deuteromycotina		
<i>Alternaria kikuchiana</i>	6.3	6.3
<i>Alternaria mali</i>	25	25
<i>Alternaria padwickii</i>	3.1	3.1
<i>Botrytis cinerea</i>	0.8	0.8
<i>Cercospora beticola</i>	1.6	1.6
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	1.6	13
<i>Fusarium nivale</i>	13	50
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	6.3	3.1
<i>Fusarium roseum</i> f. sp. <i>cerealis</i>	1.6	1.6
<i>Fusarium solani</i>	13	6.3
<i>Helminthosporium sigmoideum</i>	1.6	25
<i>Penicillium digitatum</i>	0.2	0.2
<i>Penicillium italicum</i>	1.6	3.1
<i>Pseudocercospora herpotrichoides</i>	0.8	0.8
<i>Pyricularia oryzae</i>	1.6	1.6
<i>Septoria tritici</i>	0.05	0.1
<i>Trichoderma viride</i>	1.6	1.6
<i>Verticillium dahliae</i>	1.6	1.6
Zygomycotina		
<i>Mucor fragilis</i>	25	25
<i>Rhizopus oryzae</i>	0.2	3.1

^{a)} MIC was measured on potato sucrose agar medium.

Table 4 Effect of ipconazole against rice seed-borne diseases.

Fungicides and application methods	Control % ^{a)}			
	Bakanae disease		H. leaf spot ^{d)}	Blast ^{e)}
	BI-sensitive ^{b)}	BI-resistant ^{c)}		
ipconazole 6% WP				
200-fold, 24 hr dip	100	99	100	98
20-fold, 10 min dip	100	99	97	100
0.5% wetted dressing	99	—	—	—
7.5-fold 3% spray	100	—	—	—
thiram-benomyl WP				
200-fold, 24 hr dip	99	18	43	97
20-fold, 10 min dip	—	51	88	—
untreated ^{f)}	(26.4)	(56.8)	(9.4)	(10.0)

^{a)} Based on percentage of diseased seedlings of untreated reference. Mean value of tree replications. ^{b)} Rice plant, cv. Tanginbozu, was inoculated with conidial suspension of benzimidazole-sensitive isolate at flowering stage. ^{c)} Rice plant, cv. Tanginbozu, was inoculated with conidial suspension of benzimidazole-resistant isolate at flowering stage. ^{d)} Rice plant, cv. Yamahoushi, *Helminthosporium* leaf spot naturally infected seeds. ^{e)} Rice plant, cv. Sasanishiki, blast naturally infected seeds.

^{f)} Incidence of diseased seedlings (%) for Bakanae disease and blast. For *Helminthosporium* leaf spot, Index of incidence = $[(4 \times n_4 + 3 \times n_3 + 2 \times n_2 + n_1) / (4 \times N)] \times 100$. n_x : number of seedlings with disease at following locations. n_1 : the first leaf sheath. n_2 : within the second leaf. n_3 : within the third leaf. n_4 : damping-off. N : total number of seedlings.

Table 5 Fungicidal activity of metconazole against *Septoria* spp. on wheat.

Treatment	Dose g a.i./ha	Average control (%) on leaves 1 and 2		
		<i>S. tritici</i> ^{a)}	<i>L. nodorum</i> ^{b)}	
metconazole	48	81	—	—
metconazole	60	83	—	—
metconazole	70	87	84	53
metconazole	90	—	87	62
standard A ^{c)}	250	82	86	65
standard B ^{c)}	100	82	—	—
standard C ^{d)}	200+100	—	84	—
untreated (% infection)		(60)	(39)	(28)
country		U.K.	France	Germany
number of trials		8	9	5
years		'91&'92	'92	'91&'92

a) *Septoria tritici*. b) *Leptosphaeria nodorum*. c) other triazole type fungicides. d) other triazole type fungicide+benzimidazole type fungicide.

Septoria などに高い活性を有することが特徴である^{18,19)} (Table 3). 両剤とも殺菌スペクトルには大きな違いはないが、植物生長調節活性が異なり、それが両剤の適用場面を分けている主な理由となっている。

2. 圃場試験活性

イブコナゾールはイネの種子伝染病害として重要なイネばか苗病、いもち病、ごま葉枯病や、トリコデルマやリゾプスによる苗立枯病などに高い防除効果を示し、さらに作物に対して高い安全性を有することから、イネ種子消毒に有効な薬剤である²⁰⁾。また、ベンズイミダゾール系耐性菌、および一部のアゾール剤の低感受性菌にもその高い殺菌活性から十分な防除効果が得られた²¹⁾ (Table 4)。一方、メトコナゾールは90 g/ha以下の低用量でムギ茎葉病害の赤さび病、黄さび病、セプトリア病、穂のフザリウム病などに高い予防効果と治療効果を有する^{19,22)} (Table 5)。本剤はヨーロッパのムギ病害防除体系の中期、後期処理で重要なさび病、セプトリア病、フザリウム病に特に優れている。さらに、ナタネの黒斑病や菌核病にも適用が広がり、その微妙な植物生長抑制作用による倒伏防止効果も相まって大幅な収量増加をもたらすことが見いだされている。

安 全 性

1. 人畜毒性与環境生物への影響

イブコナゾールおよびメトコナゾールの急性毒性は、経口(ラット雄)LD₅₀は、それぞれ1338 mg/kg, 1459 mg/kg, 経皮(ラット)LD₅₀は共に2000 mg/kg以上、皮膚刺激性(ウサギ)は共に弱い刺激性、皮膚感作性(モルモット)と変異原性(Ames)は共に陰性であった^{19,20)}。いずれの剤も哺乳動物へは普通物、魚毒性はB類に相当する。鳥類、ミ

ツバチ、ミミズなどへの毒性も低く、通常の使用法では使用量が少ないこともあって、環境への負荷が低い剤である。

2. 代謝分解と環境中での挙動

イブコナゾールは、種子処理において根部から茎葉部へ移行しにくく、その分解は緩慢であった。可食部(玄米)への移行、残留は認められなかった²³⁾。メトコナゾールは、茎葉処理において茎葉部から可食部への移行は認められず、比較的安定であった。両剤とも土壌移行性は小さく、圃場における土壌分解は試験土壌によって異なるが比較的すみやかであった。

お わ り に

筆者らが、探索研究をスタートした1985年当時、アゾール系殺菌剤の開発研究は世界的にもピークが過ぎ漸減しつつあるテーマであった。そのような研究環境の中で、あえて挑戦し、仮説から出発し設計したアゾール系シクロペンタノール誘導体の中から、二つのアゾール系殺菌剤を上市できたことは幸運であった。合成グループ、生物評価グループそして計算化学グループがそれぞれに、各専門分野に少なからず精通し互いに信頼し合ったことが研究の持続へつながり、新農薬の創出へ結びついたともいえる。

イブコナゾールは、全国農業共同組合連合会ならびにクミアイ化学工業株式会社の協力が実り、1994年にイネ種子消毒剤として、テクリード®の商品名で上市に結び付けることが出来た。また国内のムギ種子消毒剤として1999年12月に登録を取得した。メトコナゾールはアメリカン・サイアナミド社の協力で1994年ムギ茎葉散布剤として、フランスでCARAMBA®の商品名で販売された。今後、両剤と

もに、それぞれ特徴ある活性を発展させ、世界の安定した食糧生産に寄与することを期待している。

最後に、イブコナゾールの開発上市にあたり、ご指導ご支援を賜りました日本植物防疫協会ならびに各試験機関の諸先生方に、この場をかりて厚く御礼を申し上げます。また、イブコナゾールとメトコナゾールの創製・開発上市には、筆者らの研究のみならず、構造活性相関解析研究では京都大学名誉教授の藤田稔夫先生、代謝研究などでは理化学研究所微生物制御研究室主任の山口勇先生、山形大学名誉教授の小原平太郎先生、山形大学工学部教授の小野寺準一先生、X線結晶構造解析研究では東北大学理学部の甲千寿子先生ならびに呉羽化学の多くの研究・開発・生産・営業の関係者の多大なる努力の成果として製品化できたものであり、ここに深く感謝致します。

引用文献

- 1) W. Köller: "Target Sites of Fungicide Action," ed. by W. Köller, CRC Press, Boca Raton, pp. 119-206, 1992
- 2) K. H. Kuck: "Modern Selective Fungicides," ed. by H. Lyr, Gustav Fischer Verlag, Jena; Stuttgart; New York, pp. 205-258, 1995
- 3) H. Chuman, A. Ito, T. Saishoji & S. Kumazawa: "Classical and 3D QSAR in Agrochemistry," ed. by C. Hansch & T. Fujita, ACS Symposium Series 606, American Chemical Society, p. 171, 1995
- 4) 熊沢 智・伊藤篤史・最勝寺俊英・中馬 寛: Japan Chemistry Program Exchange Newsletter 6(4), 3 (1995)
- 5) T. Fujita: *Quant. Struct.-Act. Relat.* **16**, 107 (1997)
- 6) 高橋正明・志田隆文・熊沢 智・狩野 保・中馬 寛: 日化協月報 3月号, 4 (1996)
- 7) 熊沢 智・伊藤篤史・佐藤宣夫・最勝寺俊英・浜田正弘・山崎詞朗・江成宏之 (呉羽化学): 特公開昭 62-14967 号 (1987) (特公平 07-33949 号)
- 8) 熊沢 智・清水 進・江成宏之・伊藤篤史・池田 進・佐藤宣夫・最勝寺俊英 (呉羽化学): 特公開昭 63-41476 号 (1988) (特公平 06-25140 号)
- 9) T. Katagi: *J. Agric. Food Chem.* **36**, 344 (1988)
- 10) H. Chuman, M. Karasawa & T. Fujita: *Quant. Struct.-Act. Relat.* **17**, 313 (1998)
- 11) 伊藤篤史・最勝寺俊英・熊沢 智・中馬 寛: 第 22 回構造活性相関シンポジウム講演要旨集, p. 230, 1994
- 12) A. Ito, T. Saishoji, S. Kumazawa & H. Chuman: *J. Pesticide Sci.* **24**, 262 (1999)
- 13) T. Saishoji, A. Ito, S. Kumazawa & H. Chuman: *J. Pesticide Sci.* **23**, 129 (1998)
- 14) A. Ito, T. Saishoji & S. Kumazawa: *J. Pesticide Sci.* **22**, 119 (1997)
- 15) 中馬 寛・伊藤篤史・最勝寺俊英・熊沢 智: 農薬誌 **23**, 330 (1998)
- 16) 星 元・砂川和彦 (呉羽化学): 特公開平 1-301664 号 (1989)
- 17) The Pesticide Manual, Incorporating The Agrochemicals Handbook, Tenth Edition, Crop Protection Publications, p. 600, p. 669, 1994
- 18) 熊沢 智・伊藤篤史・最勝寺俊英・清水 進・江成宏之・美濃口正典・千田常明・佐竹慶吾: 日本農薬学会第 16 回大会講演要旨集, p. 148, 1991
- 19) A. J. Sampson, A. Cazenave, J-P. Laffranque, R. Glyn Jones, S. Kumazawa & T. Chida: Proceedings 1992 Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases, Vol. 1, p. 419, 1992
- 20) 佐竹慶吾・小林尚志: 農薬時報<臨時増刊>, p. 13 (平成 6 年 12 月 10 日発行)
- 21) H. Tateishi, T. Saishoji, T. Suzuki & T. Chida: *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **64**, 443 (1998)
- 22) E. Thienpont, D. Navarro, N. Pollet & P. Rime: Third International Conference on Plant Diseases, p. 217, Bordeaux, 1994
- 23) T. Eizuka, K. Saitoh, T. Chida, K. Satake & I. Yamaguchi: *J. Pesticide Sci.* **19**, 285 (1997)

Society Awards 2000

(on prominent achievement)

Development of New Fungicides, Ipconazole and Metconazole

INTRODUCTION

In the early 1980s our research target was to create environmentally safe and reliable agricultural chemicals with low dosage, low toxic and low resistance risk. Among several fungicidal chemical families, compounds containing an azole ring seemed to be promising and attractive for us. However, at our starting point, many so-called "azole type fungicides" had been already developed and commercialized, and some environmental problems and appearance of less-sensitive fungi had been reported for some fungicides of this family. We started the research for finding and developing a "high-performance" azole fungicide by organizing a project team consisting of organic chemists, biologists and computational chemists.

PROCESS OF RATIONAL MOLECULAR DESIGN

Our challenge to the rational design of potent and environmentally safe azole type fungicides with a novel skeletal structure was originated from the key idea; conformational control of two presumably important phenyl and azole (nitrogen containing heteroaromatic) rings for their favorable orientation with the corresponding interaction sites in the target enzyme, cytochrome P-450_{14DM} (P-450 catalyzing lanosterol C-14 demethylation step) in the ergosterol biosynthetic pathway of fungi. For conformational constraint with moderate flexibility of the two aromatic rings, a cyclopentane ring was selected as a linker between them.¹⁾ As a consequence, we were successful in discovering two novel fungicides, metconazole and ipconazole with a unique skeletal structure (1-azolylmethyl-2-benzylcyclopentanol).

We first synthesized type I compounds (no alkyl groups at the cyclopentane ring) with various types of substituent in the phenyl moiety, and measured their *in vitro* and *in vivo* fungicidal activities against several fungi. We then applied the traditional Hansch-Fujita type of QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) analyses to these compounds.^{2,3)} The QSAR correlation equations with the best statistical quality were expressed by the 1-octanol/water partition coefficient $\log P$, its squared term $(\log P)^2$ and three steric parameters, which describe the three-dimensional (3D) shape of the phenyl moiety. These equations suggested that the

introduction of a hydrophobic substituent of small bulk such as chlorine to the *para* position of the phenyl ring was most favorable to the fungicidal activity. At this stage we thus selected the *para*-chloro derivative as the best lead among 18 type I compounds.

The measured $\log P$ value of the lead (*para*-chloro type I derivative) is 3.11. From the above QSAR results, the optimum value of $\log P$ was estimated to be nearly 4, being close to the average $\log P$ value of several typical commercial azole type fungicides. The difference between the predicted optimum $\log P$ value and that of the lead corresponds to the hydrophobic substituent constant value π of CH₃ or C₂H₅ group. The average molecular volume MV of the other typical commercial azole type fungicides is also approximately 20 Å³ (nearly corresponds to the volume of CH₃ group) larger than the lead. Therefore, we planned to increase the hydrophobicity of the lead up to the predicted optimum values of $\log P$ and of MV . However, the QSAR results clearly indicated no more space for the introduction of hydrophobic groups into the phenyl moiety. In order to determine the best position for the introduction, we carried out the extensive 3D shape comparison between the lead and several other typical azole type fungicides, and simultaneously started to synthesize type II compounds (alkyl groups introduced at the cyclopentane ring). The least square superimposing procedure that takes account of conformational change of molecules (3D flexible superimposition) was developed for this purpose, and was then used here. The results indicated that the compound with *gem*-dimethyl group introduced at the 2 position of the cyclopentane ring (metconazole) was best fitted to each of the other azole type fungicides in terms of whole 3D molecular shape similarity scores. The results of the 3D comparison simultaneously indicated that the absolute configuration of its fungicidal active isomer and the active conformation (conformation when bound to the corresponding receptor). At this stage we experimentally confirmed that the optical (–) isomer of metconazole exhibits 10 to 100 times higher fungicidal activity than its corresponding (+) one.

After experimental confirmation of the dramatic activity enhancement of type II compounds, we again formulated QSAR correlation equations for the total combined set, type I and II total 32 compounds, by the

introduction of an indicator variable which takes zero and unity for type I and II compounds, respectively. The physicochemical meaning of the indicator variable was later explained as a two-state variable related to the steric interaction energy by applying a novel 3D QSAR procedure, Voronoi Field Analysis,⁴⁾ which we developed during the course of this work.

After confirming the dramatic increase of the fungicidal activity by the introduction of alkyl groups, we synthesized systematically several analogs with various alkyl substitutions at the cyclopentane ring and measured their biological activities. The potent fungicidal activity was observed in compounds with the alkyl group consisting of 2–3 carbon atoms. The apparent plant growth regulatory (PGR) activity (growth retardant effect which is common in many azole fungicides) was observed only in compounds with hydrogen-atom, mono-methyl or dimethyl group on the cyclopentane ring, and almost no PGR activity was seen in the compounds with ethyl, *n*-propyl, isopropyl, or other larger alkyls.^{5,6)} The best position for the introduction of alkyl substituents for the fungicidal activity was confirmed to be the second position of the cyclopentane ring. We further studied the effect of the ring size of the cycloalkanol on the activity. As a result, we concluded that the cyclopentane ring structure was the best for potent fungicidal activity among cyclopentane, cyclohexane and cycloheptane rings.⁷⁾ We finally selected metconazole and ipconazole as the candidates for further development and commercialization.

Based upon the results outlined above and the 3D structure of cytochrome P-450_{cam} (camphor binding P-450, first 3D structure determined P-450, 1985), the binding mode of metconazole and ipconazole with the target cytochrome P-450_{14DM} was proposed at the molecular level.

The QSAR and 3D shape comparison approaches played essential roles in the process leading to the discovery of metconazole and ipconazole. Our two novel fungicides were thus emerged from our synergetic cooperation among us, organic chemists, biologists and computational chemists.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF METCONAZOLE AND IPCONAZOLE

Both metconazole and ipconazole show a broad spectrum and high fungicidal activities against various fungi such as *Ascomycetes*, *Bosideomycetes* and *Deuter-*

omycetes. Especially, their outstanding activities against *Gibberella*, *Botrytis*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Septoria*, etc. bring beneficial characteristics to these fungicides for new azole type fungicides. There are no significant differences in the fungicidal activities between metconazole and ipconazole, however a characteristic and important difference is in their PGR activity. The PGR effect of ipconazole is much less than that of metconazole in any application methods. This is the main reason for their different application crops and methods.

Ipconazole possesses desirable property for a seed-treatment fungicide in terms of both fungicidal spectrum and plant safety. Ipconazole controls most important diseases for seed-treatment of rice such as “bakanae” disease, blast, *Helminthosporium* leaf spot, and seedling blight (*Rhizopus* and *Trichoderma*.) Due to its exceptional crop-safety, this chemical has a potential of seed-treatment on many other crops such as wheat, barley, corns, beans, and other broad leaf crops which are generally sensitive to azole compounds. Developmental work is on going.

Metconazole is very active on important cereal foliar diseases with a low dose, 90 g a.i./ha or less. This compound shows especially excellent control of *Fusarium*, *Septoria* and Rusts which are late application target diseases, therefore metconazole is recognized as one of the best late application fungicide for cereals. Recently metconazole was registered on oil-seed rape and have shown excellent yield improvement by both disease control and PGR effect for anti-lodging.

REFERENCES

- 1) S. Kumazawa, A. Ito, T. Saishoji & H. Chuman: *Japan Chemistry Program Exchange Newsletter* 6 (4), 3 (1995)(in Japanese)
- 2) H. Chuman, A. Ito, T. Saishoji & S. Kumazawa: “*Classical and 3D-QSAR in Agrochemistry*,” ed. by C. Hansch & T. Fujita, ACS Symposium Series 606, American Chemical Society, Washington, D.C., p. 171, 1995
- 3) T. Fujita: *Quant. Struct.-Act. Relat.* 16, 107 (1997)
- 4) H. Chuman, M. Karasawa & T. Fujita: *Quant. Struct.-Act. Relat.* 17, 313 (1998)
- 5) A. Ito, T. Saishoji & S. Kumazawa: *J. Pesticide Sci.* 22, 119 (1997)
- 6) T. Saishoji, A. Ito, S. Kumazawa & H. Chuman: *J. Pesticide Sci.* 23, 129 (1998)
- 7) A. Ito, T. Saishoji, S. Kumazawa & H. Chuman: *J. Pesticide Sci.* 24, 262 (1999)