

Selected Article

一般論文

イムノアッセイによる農薬測定キット 「SmartAssayシリーズ」の開発 Development of Immunoassay Test Kit “SmartAssay Series” for Pesticide Analysis

三宅 司郎

Shiro MIYAKE

農産物の収穫直前に散布される主な農薬(殺虫剤と殺菌剤)21種類について、直接競合ELISAを利用した測定キットを開発した。農薬などの低分子性物質は、それ自体に抗体産生能がないが、免疫原性を持つタンパク質表面に共有結合し接種することで抗体を産生する場合がある。このような物質をハプテンといい、農薬に対する抗体もこの性質を利用して調製した。まずハプテン設計や抗体調製の基礎的検討を行い、モノクローナル抗体が対象農薬と高い反応性を示すほか、有機溶媒耐性など農薬分析に有効な反応特性を示すことを見出した。これらの知見に基づいて開発した農薬測定キット「SmartAssay(スマートアッセイ)シリーズ」は、農産物中の残留農薬測定に適用可能との評価を得、農産物の出荷前検査に利用されている。

Twenty one kinds of direct competitive ELISA test kits were developed for checking insecticides and fungicides. The pesticides are applied just before harvests. Low molecular compounds including pesticides do not have an antibody by producibility themselves. However, some of them produce antibody by binding covalently to the surface of immunogenics protein to inoculate. These compounds are called hapten and anti-pesticide antibodies were also prepared by this behavior. In the basic examinations of hapten design and antibody preparation, it was found that monoclonal antibodies showed higher reactivity to the pesticides than polyclonal antibodies and efficient reaction property to pesticide analysis such as tolerance to organic solvent. Pesticide residue analysis test kits “SmartAssay series” developed based on such a knowledge have been evaluated by researchers as applicable to residual pesticide analysis in farm products. The kits are used for pesticide test before shipment.

はじめに

高温湿潤な日本では、作物を栽培する際に様々な病害虫が発生する。特に収穫期に発生するとその商品価値を損なうため、殺虫剤と殺菌剤などの農薬による防除が欠かせない。全ての農薬は登録制で、農薬取締法により使用者が守るべき適正な使用方法が定められている。しかしながら、基準値を超過する事例や無登録農薬が検出され

る事例が払拭されていない。一方で、食品衛生法において2006年5月からポジティブリスト制が施行され、全ての農薬について農産物ごとに残留基準値が設定され、農産物中の残留農薬に関する規制環境が整った。そのため、生産者自身が農産物の出荷前に残留農薬を検査する必要性が高まっている。

残留農薬の分析は、ガスクロマトグラフィー(GC)や高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた機器分析法を

表1 SmartAssayシリーズのラインアップ

測定項目(殺虫剤)	測定範囲(ppb)		測定項目(殺菌剤)	測定範囲(ppb)	
	下限	上限		下限	上限
アセタミプリド	0.30	4.0	イプロジオン	1.5	30
イミダクロプリド	2.0	100	イソプロチオラン	6.0	100
高感度フェントロチオン	0.15	2.0	マイクロタニル	0.2	2.0
イソキサチオン	1.0	20	イマザリル	5.0	50
クロルフェナビル	2.0	10	フルトラニル	1.0	8.0
マラチオン	15	250	ピテルタノール	9.0	50
カルバリル	1.5	30	トリフルミゾール	2.0	20
クロチアニジン	1.5	15	クロロタロニル	0.15	1.5
ジノテフラン	1.5	30	アゾキシストロビン	10	200
エマメクチン	0.30	3.0			
チアメトキサム	0.30	3.0			
ニテンピラム	5.0	100			

用いることが一般的である。機器分析法は感度や精度に優れ、質量分析計を併用することにより多くの化合物を同時に測定できる利点がある。しかし、高額な機器と専用の設置場所、農産物の前処理を含めた高度な分析技術が必要であり、生産現場での出荷前検査に適しているとはいえなかった。

機器分析法と比較して迅速・簡便・安価な測定法として、抗体を用いたイムノアッセイ*1が知られている。医療分野ではルーチンの検査業務に利用され、患者の病態の診断に貢献している。農薬についても開発されたが、主に地下水汚染などの環境分析に用いられ、農産物の出荷前検査に使用されることは少なかった。これは、従来のイムノアッセイが、農産物に由来するマトリックスの影響により測定結果の精確さに欠けたことが大きい。

このような状況の中、筆者らはモノクローナル抗体を用いた直接競合ELISA*2がマトリックスの影響を受けにくく農産物検査に適用できることを見出した^[1]。その知見に基づいて開発された21種類の農薬測定キット(表1参照)は、生産者による農産物の出荷前検査への利用が進んでいる。本稿では、農薬に対する抗体の調製法、直接競合ELISA開発とそのキット化、測定試料への適用性について概説する。

*1: 抗体を用いた測定法の総称

*2: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: イムノアッセイの一手法で、抗原或いは抗体の一方を固相に結合し、液相の抗原或いは抗体に酵素を標識して抗原抗体反応させ、反応後に洗浄することによって未反応物を除去し、固相に結合した酵素の活性を検出することにより高感度な測定を実現した測定法

抗体の調製

農薬などの低分子性物質は、動物へ接種しても代謝・排

泄されるのみで抗体を生じることはない。しかし、免疫原性を持つタンパク質表面に共有結合させて接種(免疫)すると、そのタンパク質だけでなく、結合した農薬部分に対する抗体も生じる場合がある。このような物質をハプテンといい、農薬に対する抗体もこの性質を利用して調製する。農薬によっては、タンパク質と直接結合可能な官能基を持つものもあるが、多くの場合、新たに官能基(例:カルボキシル基)を導入するなど、ハプテンの設計が必要になる。図1に、ハプテンの設計を工夫することによって

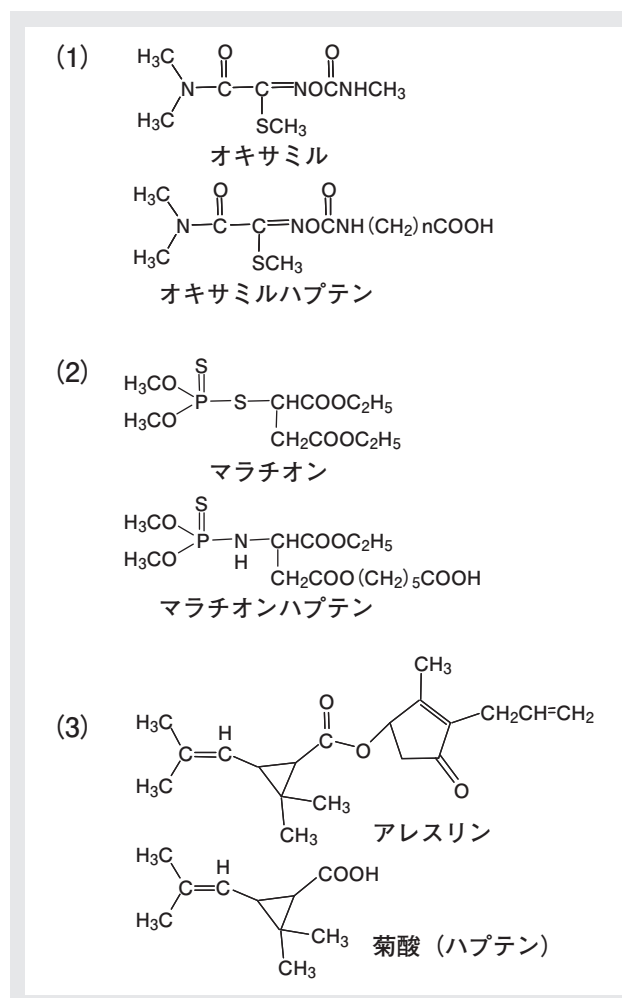


図1 農薬とそのハプテンの構造式

対象農薬に対して高い反応性を持つ抗体を調製することができた例を示した。農薬によってハプテン設計は異なるが、(1)オキサミルの場合のように、カルボキシル基導入部位のリンカー鎖($n=5\sim7$)を伸張させてタンパク質表面との相互作用を抑制する、(2)マラチオンの場合のように、生体中で不安定な化学構造を修飾し安定化させる、(3)菊酸を共通に持つピレスロイド系殺虫剤のように、グループ特異的な抗体の調製において、構造類縁物質群の共通構造をタンパク質と結合する、などが有効であることが判った^[2-4]。

抗体は、ポリクローナル抗体(PoAb)とモノクローナル抗体(MoAb)に大別される。PoAbは、免疫した動物の血液から血清を調製し抗体成分を精製したもので、対象農薬に対して、様々な反応性を持つ多様な抗体分子から成る。一方、MoAbは、生体中の1個の抗体産生細胞に由来する抗体を細胞融合技術によって調製したもので、対象農薬への反応性が単一の抗体分子から成る。PoAbとMoAbの反応特性をいくつかの農薬について比較した結果、MoAbは常にPoAbより高い反応性を示した^[1]。この理由は、PoAb中には対象農薬に対して様々な反応性を示す抗体分子が存在していて、中でも IC_{50} 値^{*3}付近の反応性を示す抗体分子が最も多いと考えられるが、MoAbではその中で極わずかに存在する高い反応性を示す抗体分子を、常に釣り上げることができたからだろうと考えている。また、農薬は疎水性の化合物が多いので、有機溶媒耐性を示す抗体の利用が測定に有効である。PoAbでは、その耐性が抗体分子毎に異なるため高耐性のものを調

製することが困難なのに対して、MoAbでは、有機溶媒耐性を指標にしたスクリーニングによりその選択が可能だった^[1]。これらの結果から、高い反応性と有機溶媒耐性を示すモノクローナル抗体を用いて、直接競合ELISAを開発することにした。モノクローナル抗体の特性によって、農産物由来の複雑で多量なマトリックス存在下でも比較的安定に農薬を測定できることが期待された。

*3: 50% of inhibition concentration value: 吸光度を50%阻害する濃度を意味する。

直接競合ELISA

直接競合ELISAは、対象物質、およびそのハプテンと西洋ワサビペルオキシダーゼ(酵素)との結合体(酵素標識ハプテン)が、それらに対する抗体と競合的に反応した後、抗体と結合した酵素標識ハプテンの酵素活性を利用して農薬濃度を測定するもので、測定時の反応ステップが少なく高感度で精確さに優れることから、様々な低分子性物質の測定に利用されている。農薬測定用イムノアッセイキットにおいても、直接競合ELISAを応用して開発した。図2にその測定フローを示すが、上のフローは試料に農薬が含まれない場合で、下のフローは農薬が過剰量含まれる場合である。農薬濃度が測定範囲の場合は、農薬濃度に依存して発色の程度が低くなることが、直接競合ELISAの特徴である。以下に、測定フローの各ステップを説明する。

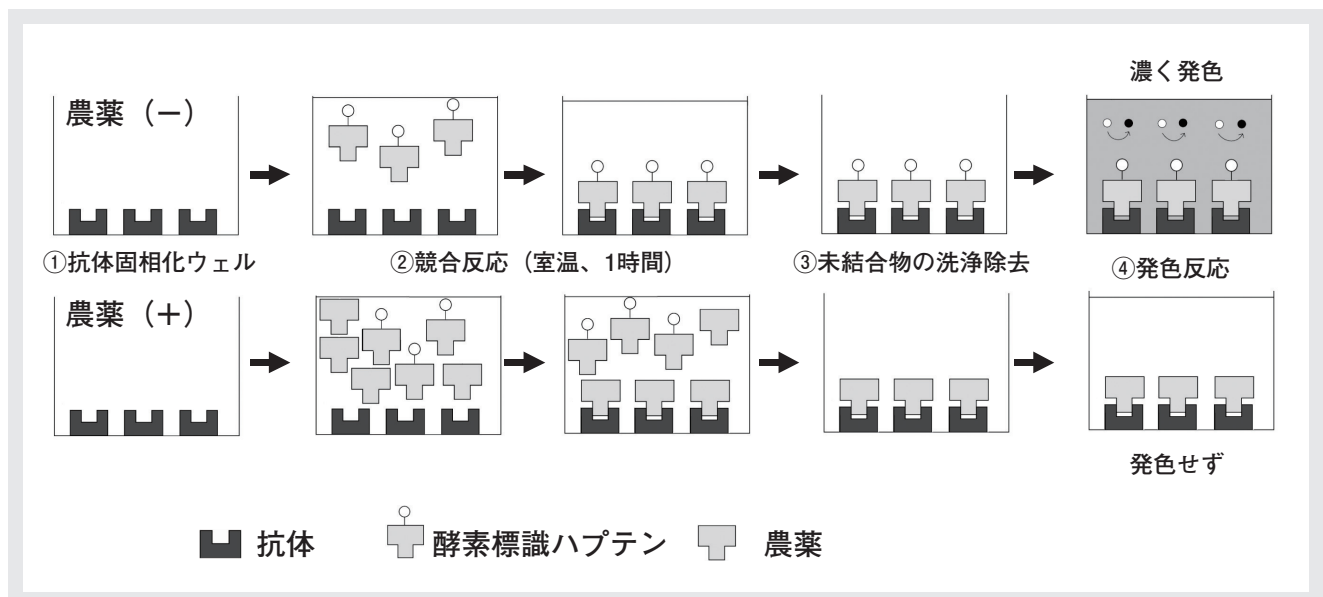


図2 直接競合ELISAの測定フロー

抗体を固相化した96ウェルマイクロタイタープレートの各ウェル上に、測定対象農薬と酵素標識ハプテンの5%メタノール溶液を加え、室温で1時間競合反応させる。抗体などの濃度は、予め必要な測定範囲と吸光度が得られるよう調整する。通常、測定範囲は抗体の反応性に依存し、吸光度は酵素標識ハプテンの濃度に依存する。

競合反応後、そのウェルを生理食塩水などで3回洗浄し、固相化抗体と結合しなかった酵素標識ハプテンや農薬を除く。抗体を介してウェルの固相に結合した酵素の発色基質として、テトラメチルベンジジンを含む溶液を加え、室温で10分間発色後0.5 M硫酸を加えて反応を停止させる。この際、希硫酸により酵素が失活すると共にpHが下がるため発色液の色が青色から黄色に変化し、安定化する。

発色停止後の吸光度を、マイクロプレート専用の分光光度計で測定する。測定試料に含まれる農薬濃度が高い場合には、抗体に結合する酵素標識ハプテン量が少なくなるので発色の程度が抑えられ、農薬濃度が低い場合には強く発色する。標準農薬濃度をx軸、対応する吸光度をy軸にとって検量線を作成し、測定試料の吸光度を当てはめてその農薬濃度を求める。図3に、ジノテフラン測定キットの検量線(2点検量)と5点検量による標準曲線を例示した。一般に標準曲線はシグモイドカーブを描くため多点検量を用いる場合が多いが、農薬測定キット「SmartAssayシリーズ」では、その直線性の高い範囲に絞って2点検量による直線領域を測定範囲としている。これは、検量線に使用するウェル数を最小限にして測定可能な検体数を多くすることが目的である。図から明らかな通り、2点検量でも実用的な正確さは確保されている。

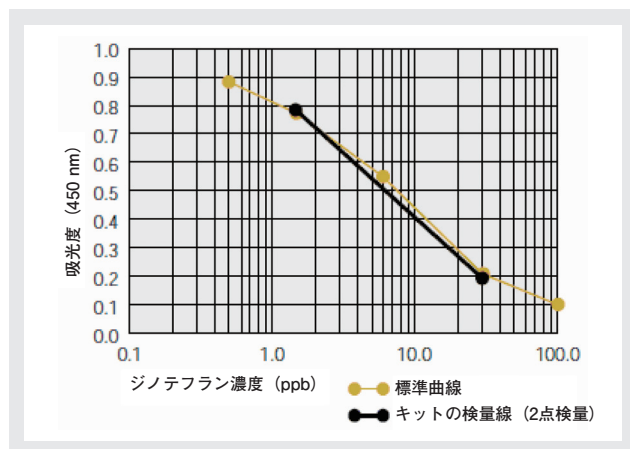


図3 検量線の例(ジノテフラン測定キット)

キット化

直接競合ELISAを自身で作製し測定に用いる場合、測定前に数多くの準備を行う必要がある。まず96ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルへ所定濃度に希釈した抗体を分注、一晚4℃で静置して抗体を固相化、ブロッキングを経て抗体プレートを作製する。通常作製に1日必要である。酵素標識ハプテンは、使用濃度の100倍のものをバイアルに分注して冷凍保存し、測定時に溶解・希釈する。検量線作成に使用する農薬標準液と発色基質は分解しやすく、測定の都度調製する必要がある。また、しばしば調製間差が大きく測定結果に精確さを欠く原因になる。

キット(図4参照)は、これらの調製を省略できるように製剤化したもので、同時に試薬の安定化が図られている。キットを用いることによって、煩雑な測定準備に追われることなく農薬を検査できる。また、製品性能を一定の範囲で保証しているため調製間差を保証の範囲内で考慮すればよく、測定者の技術、測定装置、測定条件を検証することで精確さを確保することができる。



図4 SmartAssayシリーズ ニテンピラム測定キット

試料の測定

イムノアッセイは、機器分析法と異なり農産物の前処理において基本的に精製を必要としない。野菜・果実類を対象にした前処理条件では、まず試料を細切しミキサーで約1分間磨砕均一化する。遠沈管に5 gを量り取り、メタノール25 mLを加えて30分間振とう抽出する。抽出液をろ過し、そのろ液を7.5倍量の精製水で希釈する。これらの操作により試料中のメタノールは、10%相当に希釈される。通常この希釈液を測定試料とすることで、農産物

中の農薬をキットで測定できる。

渡辺らは、SmartAssayシリーズの幾つかのキットについて機器分析法との相関性を調べた。その結果、イミダクロプリド測定キットでは、ピーマンでHPLCとの相関係数(r)が0.913と若干の差異を認めたと、きゅうり、なす、レタスでは $r=0.979$ 以上と高い相関性を示した^[5]。また、クロロフェナピル測定キットでは、りんごと梨を用いた試験で、それぞれ $r=0.989$ 以上と高い相関性を示した^[6]。一方、クロロタロニル測定キットでは、GCに質量分析計を組み合わせたGC/MSの結果と回帰直線の傾きが、イムノアッセイ側に偏ったものの高い相関性($r=0.986$)を示した^[7]。傾きが偏った原因については、クロロタロニルが農産物中で不安定な農薬のため、工程の多いGCの前処理で分解が進んだためであろうと考察している。渡辺らは、これらの結果からイムノアッセイが、簡易かつ迅速なスクリーニング検査法として有望な手段と考察している。

一方、SmartAssayシリーズにおいても、農薬とともに抽出される農産物由来のマトリックスが、正常な反応を妨害する可能性があることが、学会などで報告されている。その影響と回避方法は、天野による技術解説に詳しく書かれ、(1)測定試料を10%メタノールでさらに希釈する、(2)測定試料を限外濾過する、(3)活性炭やミニカラムにより精製する、などが有効である^[8]。天野も、キットの特徴をよく理解して上手に活用することで、その力が十分に発揮できるはずと纏めている。SmartAssayシリーズは高い反応性と有機溶媒耐性を示すモノクローナル抗体を利用して開発した結果、農産物に由来するマトリックス影響を抑制することによって農産物中の残留農薬測定を実現した。しかしながら、キットと農産物の組み合わせによってはその影響を受ける場合があることも事実である。使用する前には必ず影響の有無を検証し、影響があった場合にはその回避方法を確立の上、使用して戴きたい。

おわりに

イムノアッセイは、機器分析と比較して ①高価な測定装置を必要としない、②前処理が簡便で迅速である、③高度な知識と測定技術を必要としない、④多数の検体を同時に測定できるといった利点がある。従って、農産物の出荷前に多数の検体を検査する必要がある農産物集出荷場などでの農薬検査に有効といえる。実際に、農協や卸売市場を中心にSmartAssayシリーズを用いた出荷前

検査の普及が進んでいるが、他にも測定対象農薬の明らかな現場、例えば農薬の効力試験、森林害虫への残効性確認、環境モニタリングなどで活用され始めている。

以上、農薬測定用ELISA「SmartAssayシリーズ」について、その技術基盤であるハプテン設計と抗体調製、直接競合ELISAによるキット開発とその適用性について概説した。本稿により、農薬がイムノアッセイによって迅速・簡便・高感度に測定可能なことをご理解戴くと共に、ユーザーの皆様がキットを用いて農薬分析する際の参考になれば幸いである。

参考文献

- [1] 三宅司郎 日本農薬学会誌, 35(2), 176-180(2010)
- [2] S. Miyake, K. Morimune, Y. Yamaguchi, K. Ohde, M. Kawata, S. Takewaki & Y. Yuasa: J. Pesticide Sci. 25, 10-17(2000)
- [3] K. Nishi, Y. Imajuku, M. Nakata, K. Ohde, S. Miyake, K. Morimune, M. Kawata & H. Ohkawa: J. Pesticide Sci. 28, 301-309(2003)
- [4] S. Miyake, R. Beppu, Y. Yamaguchi, H. Kaneko & H. Ohkawa: Pestic. Sci. 54, 189-194(1998)
- [5] E. Watanabe, H. Eun, K. Baba, T. Arai, Y. Ishii, S. Endo & M. Ueji: Anal. Chim. Acta 521, 45-51(2004)
- [6] E. Watanabe, K. Baba, H. Eun, T. Arai, Y. Ishii, M. Ueji & S. Endo: J. Chromatogr. A 1074, 145-153(2005)
- [7] E. Watanabe, S. Miyake, S. Ito, K. Baba, H. Eun, M. Ishizaka & S. Endo: J. Chromatogr. A 1129, 273-282(2006)
- [8] 天野昭子 日本農薬学会誌, 35(3), 396-400(2010)



三宅 司郎

Shiro MIYAKE

株式会社堀場製作所
医用システム統括部
医学博士