

農薬のイムノアッセイの利用と問題点

株式会社ヤトロン **三宅 司 郎**
 農林水産省農業環境技術研究所 **いし 康 雄**

はじめに

農薬は、雑草や病害虫の防除に用いられ、農産物を安定に生産するために大きな役割を果たしてきた。しかもその開発の過程で、人に対する安全性を高く保つために多くの努力が払われてきた。現在使用されている農薬は、安全性に十分な配慮がなされているといつてよい。しかしその一方で、消費者をはじめとする多くの人が、農薬の環境や健康に与える影響について大きな関心を抱いている。彼らの不安を払拭し、農薬のより効果的かつ安全な使用法を探るために、農薬の影響の科学的な解析を進めることが重要である。

農薬の環境や健康に与える影響を調べるためには、まず環境中での動態や農産物中での残留の実態を把握しなければならない。このようなモニタリングは、より多くの試料を系統的かつ継続的に測定することによって信頼性が得られる。通常、農薬の測定には、ガスクロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーなどが用いられる。これらは、高感度で精度が高い反面、試料の前処理が煩雑で分析に日数がかかるなどの問題点があった。

最近、農薬の新しい測定法としてイムノアッセイ（免疫測定法）が注目されている。イムノアッセイは、医療

現場で疾病マーカーの測定に汎用されており、迅速・簡便かつ高感度に多くの試料を測定できることから、農薬の測定においてもその効果が期待される。ここでは、私たちが開発中のイムノアッセイを紹介しながら、その利用法と問題点について考えてみたい。

I イムノアッセイの測定原理

イムノアッセイは、抗原抗体反応を応用した測定法である。したがって、その性能は、抗体の反応特性に依存するといえる。農薬のような低分子化合物は、それ自体に免疫原性がなく、タンパク質などと化学的に結合することによって免疫原性を得る。言い換えると、農薬とタンパク質の結合体を免疫して得た抗体は、農薬を抗原として認識する。農薬に対する抗体の調製法については、中田・大川（1996）の総説を参考にしていきたい。抗体には、図-1に例示したように、抗原に対して多様な反応性を示す抗体分子が含まれる（ポリクローナル抗体）。一方、抗体分子のうち、最も対象農薬との反応性が高い分子のみをモノクローナル抗体として選択することもできる（三宅ら、1998、2000）。これらの抗体は、多くの夾雑物の存在下で農薬と特異的に反応する。

農薬のイムノアッセイには、一般的に競合反応が利用

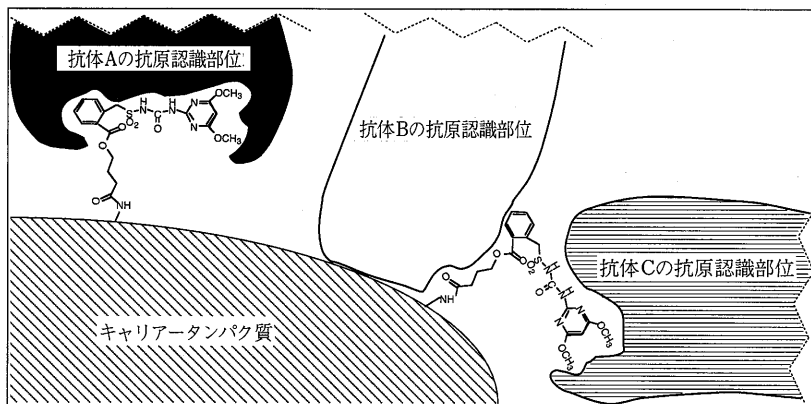


図-1 タンパク質に結合したベンスルフロメチル誘導体とポリクローナル抗体の反応性模式図

表-1 イムノアッセイ試薬の構成

抗体固相化プレート	モノクローナル抗体を固相化した96ウェルマイクロタイタープレート
試料希釈液	トリス緩衝液
酵素標識農薬溶液	農薬の誘導体と西洋わさびペルオキシダーゼとの結合体を含むトリス緩衝液
発色基質調製液	過酸化水素を含む酢酸緩衝液
発色基質溶液	テトラメチルベンジジン溶液
発色停止液	1N 硫酸
洗浄液	ツィーン20を含むリン酸緩衝液

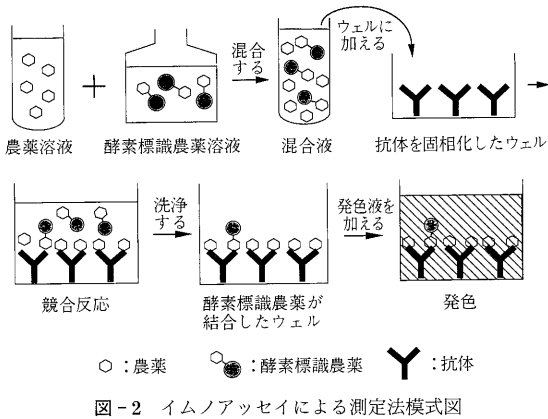


図-2 イムノアッセイによる測定法模式図

される。競合反応は、酵素などで標識した農薬（標識農薬）と農薬が、抗体に対して競合的に反応することで成立する。標識農薬と抗体との反応は農薬の濃度に依存して阻害されるので、抗体と結合した標識農薬を定量することによって、加えられた農薬濃度が測定できる。

II イムノアッセイによる農薬の測定法

農薬の測定には、イムノアッセイの中でも直接競合ELISAが汎用される。ここでは、私たちが試薬化した直接競合ELISAを例に、対象農薬の標準曲線の求め方を説明する。表-1には試薬構成を、図-2には測定法の模式図を示した。測定法の詳細なマニュアルをGEE et al. (1996)がまとめているので参考にしてほしい。

1 農薬溶液の調製

農薬標品をメタノールに溶解後、メタノール濃度が1%（水試料を測定する場合）か20%（抽出後の試料を測定する場合）となるように、試料希釈液で希釈する。農薬濃度は、測定範囲を網羅するよう3~5段階とる。

2 発色液の調製

発色基質調製液と酵素の発色基質溶液を100:1の割合で混合する。混合は、後述の競合反応終了直前に行う。

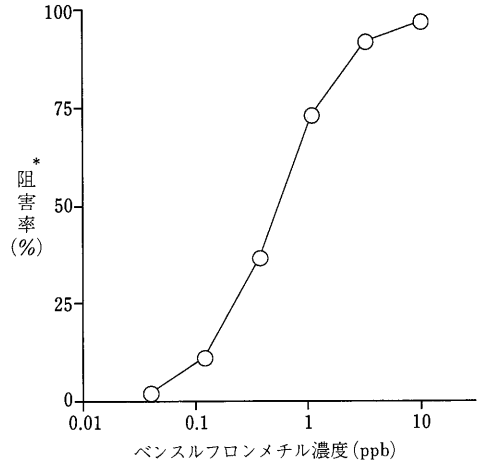


図-3 イムノアッセイによるペンシルフロメチルの標準曲線

$$* \text{阻害率}(\%) = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A = 農薬未添加区の吸光度

B = 農薬添加区の吸光度

3 測定

試験管に、調製した農薬溶液と等量の酵素標識農薬溶液を加え混合する。この混合液を、モノクローナル抗体を固相化した96ウェルマイクロタイタープレートに100 μl/ウェルの割合で加え、室温で1時間競合反応する。反応終了後、洗浄液で各ウェルを3回洗浄し、調製した発色液を100 μl/ウェルの割合で加える。室温で10分間発色させた後、発色停止液で反応を止める。各ウェルの450 nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定する。

4 標準曲線の作成

反応に使用した農薬の濃度と測定した吸光度の関係から、農薬の標準曲線を作成する。図-3に除草剤ペンシルフロメチルの標準曲線を示した（石井ら, 1998）。私たちは、阻害率20~80%を有効な測定範囲としている。

III 水試料中に含まれる農薬の測定

水が試料の場合、直接酵素標識農薬溶液と等量混合し、上述の測定法で測定する。試料中に含まれる農薬濃度は、得られた吸光度を標準曲線と比較することによって求める。図-4に、水試料中のペンシルフロメチルをイムノアッセイと機器分析で測定し、相関性を調べた結果を示した。試料には、その製剤を散布した水田から経日的に採取した表面水を用いた。図から明らかのように、両測定法は測定メカニズムが違うのにもかかわらず、良好な相関性を示した。これはイムノアッセイが、

機器分析と同様に水試料中の農薬を測定できることを示している。

イムノアッセイの特徴をまとめると、①試料は、1 ml もあれば十分である、②抽出・精製操作なしに、直接試料中の農薬を測定できる、③3時間当たり、100 検体程度の試料を測定できる、などが挙げられる。一方、問題点として、④採取場所での農薬の分布が不均一な場合、必要な試料が少量なのでサンプリング誤差を生じる、⑤交差反応性のある類縁農薬や代謝物を測り込む、⑥試料に夾雑する物質が測定に影響を与える可能性を否定できない、などがある。問題点のうち、④は採取する試料数を増やすことで解消されるが、⑤と⑥の完全な解消法は見いだせない。むしろ、これらの問題を考慮しながら結果を解析するほうが現実的である。

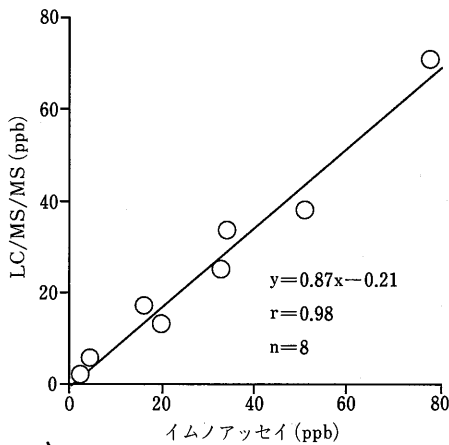


図-4 水試料中のベンスルフロンメチル測定におけるイムノアッセイと機器 (LC/MS/MS) 分析法との相関性

私たちは、特異性の高いモノクローナル抗体を用いることによって、これらの影響の軽減に努めている。また限定的ではあるが、測定に大きな影響を及ぼす水試料は経験していないことを付記する。今後さらにデータを蓄積し、機器分析と測定結果の異なる試料の出現頻度などを調べる必要がある。

IV 農産物に残留する農薬の測定

農産物中の農薬を測定する場合、イムノアッセイでも機器分析と同様に有機溶媒で抽出する必要があり、抗体や酵素への影響が少ないメタノールが汎用される。また試料は、2 倍から3 倍程度のメタノールを加えて抽出されることが多い。これはイムノアッセイの測定値が、抽出された農薬の量ではなく濃度によって決まるからである。得られた抽出液は沱過後、20%メタノール相当となるように試料希釈液を用いて希釈し、酵素標識農薬溶液と等量混合後、測定に供する。

図-5 に、各農産物のメタノール抽出液に殺虫剤 MEP を添加後測定し、標準曲線と比較した結果を示した。トマトとキュウリの抽出液は測定に影響ないが、イチゴでは吸光度が抑制された。イチゴは、他農薬のイムノアッセイでも吸光度を抑える場合が多い。現在、このような

表-2 農産物に添加した MEP の測定

農産物	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)
トマト	0.02	90
	0.2	98
キュウリ	0.02	106
	0.2	103

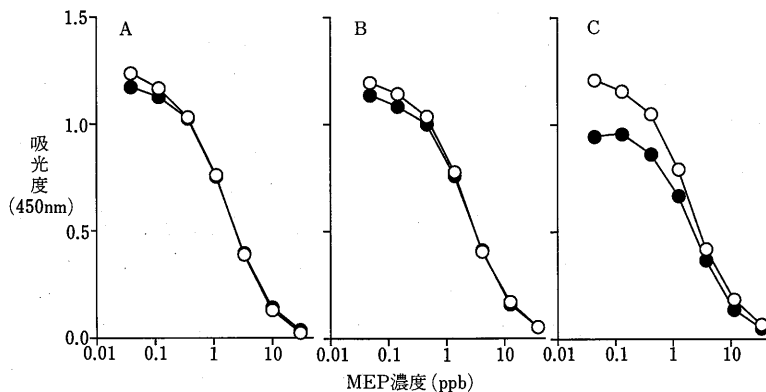


図-5 MEP の測定における抽出液の影響

A: トマト, B: キュウリ, C: イチゴ, ○—○: MEP 標準曲線, ●—●: 抽出液による反応曲線

表-3 開発中のイムノアッセイ試薬

殺虫剤	EPN	MEP	NAC
	アセタミプリド	イソキサチオン	イミダクロプリド
	エチオフェンカルブ	オキサミル	クロルフエナビル
	クロルベンジレート	ダイアジノン	ピリミカーブ
	フェンスルホチオン	マラソン	メチオカルブ
	メチルパラチオン		
殺菌剤	イソプロチオラン	イプロジオン	イマザリル
	カルプロバミド	トリフルミゾール	トルクロホスメチル
	ピテルタノール	フルスルファミド	フルトラニル
	プロピコナゾール	プロベナゾール	ミクロプタニル
	メプロニル		
除草剤	2,4,5-T	ピラゾスルフロンエチル	ピリミノバックメチル
	ブタミホス	プレチラクロール	プロピザミド
	ペンスルフロンメチル	ペンタゾン	ベンチオカーブ
	メフェナセット		
その他	イナベンフィド	クロルメコート	メトブレン

表-4 市販されているイムノアッセイ試薬

CAT ^{a),b)}	DDT ^{a)}	MEP ^{a)}	NAC ^{a),b)}
2, 4-PA ^{a),b)}	PCB ^{b)}	2, 4, 5-TP ^{a),b)}	TPN ^{b)}
アセトアニリド ^{a)}	アトラジン ^{a),b)}	アラクロール ^{a),b)}	アルジカルブ ^{a),b)}
イソプロツロン ^{a)}	イマザリル ^{a)}	カルボフラン ^{a),b)}	キャプタン ^{a),b)}
クロルスルフロン ^{a)}	クロルデン ^{a)}	クロルピリホス ^{a),b)}	クロルピリホスメチル ^{a)}
シアナジン ^{a),b)}	シクロジエン ^{a),b)}	スピノサド ^{a),b)}	ダイアジノン ^{a)}
チアベンダゾール ^{a)}	トキサフェン ^{a)}	トリアジン ^{a)}	トリアスルフロン ^{a)}
トリクロピル ^{a),b)}	トリクロロピリジノール ^{a),b)}	パラコート ^{a),b)}	パラチオン ^{a)}
ピオレスメトリン ^{a)}	ピリミホスメチル ^{a)}	プロシミドン ^{a),b)}	ベノミル ^{a),b)}
ペンゾエピン ^{a)}	メソミル ^{a),b)}	メトラキシル ^{a),b)}	メトスルフロンメチル ^{a)}
メトブレン ^{a)}	メトラクロール ^{a),b)}	メトリブジン ^{a),b)}	モリネート ^{a)}
リンデン ^{a)}	尿素系除草剤 ^{a)}		

a: チッソ株式会社, b: セティカンパニーリミテッド

影響を回避できる測定条件を検討している。一方、トマトとキュウリに MEP を添加後抽出し測定を試みた結果、表-2 に示したように、両者とも良好な回収率が得られた。榊 (2000) は、TPN 製剤を散布したキュウリを収穫し、市販の TPN 用イムノアッセイ試薬でその残留量を測定した。その結果、得られた測定値は機器分析の結果とほぼ同じ値を示し、かつ 1 日当たり 100 検体の試料を測定できた。また林 (1999) は、リング中の NAC やキュウリ中のプロシミドンの測定を試み、市販のイムノアッセイ試薬の測定結果が、機器分析の結果と良好な相関性を示したことを報告している。これらの結果はまだ極めて限定的であるが、イムノアッセイが農産物中の農薬の測定に有効なことを示唆するものと考えられる。

農産物を対象としたイムノアッセイの特徴をまとめると、①少量の試料を少量のメタノールで抽出する、②精製操作なしに測定できる、③1 日当たり、100 検体程度

の試料を測定できる、などが挙げられる。一方、問題点として、④抽出に使用できる有機溶媒に限られる、⑤水試料同様、交差反応性のある類縁農薬や代謝物を測り込む、⑥対象とする農産物によっては、抽出液が測定に影響する、などがある。特に、あらかじめ対象農産物の抽出液が測定に影響しないことを確認することは重要である。

V 試薬の開発状況

平成 7 年に、(株)環境免疫技術研究所が設立され、大塚化学、クミアイ化学工業、コスモ総合研究所、東レリサーチセンター、日本ミリポア、そしてヤトロン[®]の 6 企業が参加して、農薬など環境負荷化学物質に関するイムノアッセイの研究開発を始めた。当研究所を中心に関係企業も含めて開発中のイムノアッセイ試薬 (42 農薬) を表-3 に記載した。これらのうち、すべてが実用に耐えるとは限らないが、今後、農薬分析に有効な手段を提

供できるものと思われる。一方、表-4に、現在市販されているイムノアッセイ試薬を記載した。両者は対象農薬が大きく異なり、重複しているものを除くと合計83種類の農薬がイムノアッセイで測定可能である。これらの操作法は入手先によって若干異なるが、すべて直接競合ELISAが基本になっている。

おわりに

イムノアッセイは、機器分析と比較して迅速・簡便に農薬を測定できることから、農薬のモニタリングに適した測定法と考えられる。しかし機器分析と測定技術が異なるので、慣れるまで若干の練習が必要である。測定結果に関しても、交差反応性や試料そのものの影響を考慮しながら結果を解析する必要がある。また、試薬が抗体や酵素などのタンパク質で構成されているので、室温で

放置しないなど試薬の取り扱いに注意が要る。

イムノアッセイの利用に当たっては、これらの問題に注意しながらその特徴を生かしていただければと思う。今後、イムノアッセイが農薬の分析に有効に活用されることを願っている。

引用文献

- 1) GEE, S. J. et al. (1996): Environmental Immunochromatography for Detection of Pesticides and Other Chemicals, Noyes Publications, New Jersey, USA, 107 pp.
- 2) 林 明子 (1999): 免疫化学測定法研究会年報 3: 55~58.
- 3) 石井康雄ら (1998): 日本農薬学会第23回大会講要: p 142.
- 4) MIYAKE, S. et al. (1998): Pestic. Sci. 54: 189~194.
- 5) ——— et al. (2000): J. Pesticide Sci. 25: 10~17.
- 6) 中田昌伸・大川秀郎 (1996): 蛋白質核酸酵素 41(14): 2132~2138.
- 7) 榊 祐子 (2000): 農業くまもと 13(1): 32~33.

発行

日本植物防疫協会

「昆虫の飼育法」

湯嶋 健・釜野静也・玉木佳男 共編

収録種(項目)数 126種

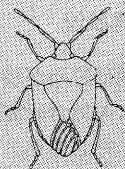
B5判 本文400ページ

定価12,232円(本体11,650円+税)

送料サービス

昆虫の飼育法

湯嶋 健 | 編
釜野静也 |
玉木佳男 |



社団法人 日本植物防疫協会

昆虫の飼育法について、実際に飼育に従事されている方に、独特のコツを含めて詳述していただいた。総論では、共通性のある、餌の種類/人工飼料の調整/飼育虫の病気対策/虫質管理/飼育環境/飼育施設/飼育計画と作業計画などを、各論では、126種(項目)の虫につき、材料の採集/餌/飼育法/作業計画/注意事項と問題点/参考文献などを詳述。付録に、ビタミン混合とその作り方、無機塩混合物とその作り方、昆虫用市販人工飼料リストを付す。

〈お申し込みは前金(現金書留・郵便振替)で本会まで〉