

ELISA法による除草剤の簡易微量測定法

神戸大学農学部 生物環境制御学科 中田 昌伸・大川 秀郎

はじめに

除草剤は多くの場合、植物に特徴的な生理機能に作用して枯死させるため、人を含む哺乳動物に対する毒性が低いという認識があった。また、除草剤は栽培前や栽培の比較的初期に施用されるので、収穫した作物に残存する量はわずかであると考えられていた。むしろ、土壌に残存する薬剤が次に栽培される作物に与える影響が問題であり、それと共に、畑あるいは水田に散布された除草剤のうち水溶性の化合物は流亡して水系に入り、河川水や地下水の汚染が問題になっていた。E. Funari¹⁾らは1987年～1993年における地下水の残留除草剤を測定したデータを国内外から集めて報告している。これによると、2,4-Dとアトラジンは検出される頻度が高く、アラクロール、クロルタルメチル、ブロマシル、アトラジンは最大値と共に平均値が高かった。わが国では水田排水口や河川に流亡した残留除草剤について丸²⁾らによる測定報告がある。さらに、ゴルフ場に散布した農薬が水系へ流亡する等の問題を契機として、厚生省により除草剤の19種類について残留基準値が設定された。これらの除草剤には、水田に散布されるベンチオカルブ、畑地や非農耕地に使用されるトリアジン系のメトリブジンがある。また、海外で使用されたポストハーベスト農薬の中で、収穫後のジャガイモなどの萌芽防止剤として使用されるク

ロプロファム、マレイン酸ヒドラジドやジメチピンなどの植物生長調節剤、あるいは、収穫物の乾燥を早めるためのグリホサートなどがある。さらに、シマジンとチオベンカルブについては飲料水における水質基準値が設定されている。このように残留除草剤の土壌、水質における測定が広範囲に実施される時代になった。

これまでに除草剤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)による機器分析によって測定されてきた。機器分析は極めて微量を精密に分析することができるが、機器設備費が高く、サンプルの抽出・クリーンアップに時間が掛かり、しかも、熟練した分析技術者を必要とし、分析機関に限られ、時間が掛かり、経費が高くなる。従って、多数のサンプルを短時間に処理することが難しい。そこで、それに代る高感度、迅速性、簡便性、経済性を備えた新たな測定法の開発が求められてきた。免疫化学測定法は抗体・抗原反応の特異性と高感度性を利用した測定法であり、残留農薬の測定には酵素を標識とした酵素免疫測定法(Enzyme Immunoassay)が導入された。この測定法のなかでEnzyme Linked Immuno Sorbent Assay(ELISA)による測定キットが開発された。まず、水系における除草剤の測定のためのキットが開発され、その後、殺虫剤、殺菌剤の測定キットの開発が進められ

ている。そこで、残留除草剤の測定を中心に、ELISAの原理、並びに、それを用いた除草剤の測定について述べ、さらに、除草剤の測定における免疫化学測定の可能性と問題点を考察したい。なお、農薬の一般的な免疫化学測定法について Jung³⁾らの総説、また、除草剤については Hall⁴⁾らの総説がある。

1. Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA)

ELISAは抗体あるいは抗原を固定化した状態で、酵素活性を標識として抗原・抗体反応を追跡し、抗原または抗体の量を定量する方法である。抗体の特性がこの方法の優劣を決定する最も重要な要因である。抗原分子上には抗体が結合する部位(エпитープ)が通常は複数存在する。哺乳動物を免疫原で免疫して得られる

抗血清にはエпитープを特異的に認識する複数の抗体が混在したポリクローナル抗体が得られる。一方、特定の抗体を産生する細胞(Bリンパ細胞など)を骨髄腫細胞(ミエローマ)と細胞融合したハイブリドーマからはモノクローナル抗体が分泌される。これらのポリクローナル、モノクローナル抗体について、それらの特性を発揮できる抗原・抗体反応の条件、標識した酵素の反応などの最適な条件を決定してELISA法を確立する。

2. ハプテンデザイン

蛋白質や核酸のような高分子化合物と違って、農薬のような低分子化合物は哺乳動物に直接免疫してもそれに特異的に反応する抗体は得られない。そこで、牛血清アルブミン(BSA)、スカシガイヘモシアニン(KLH)、オバアル

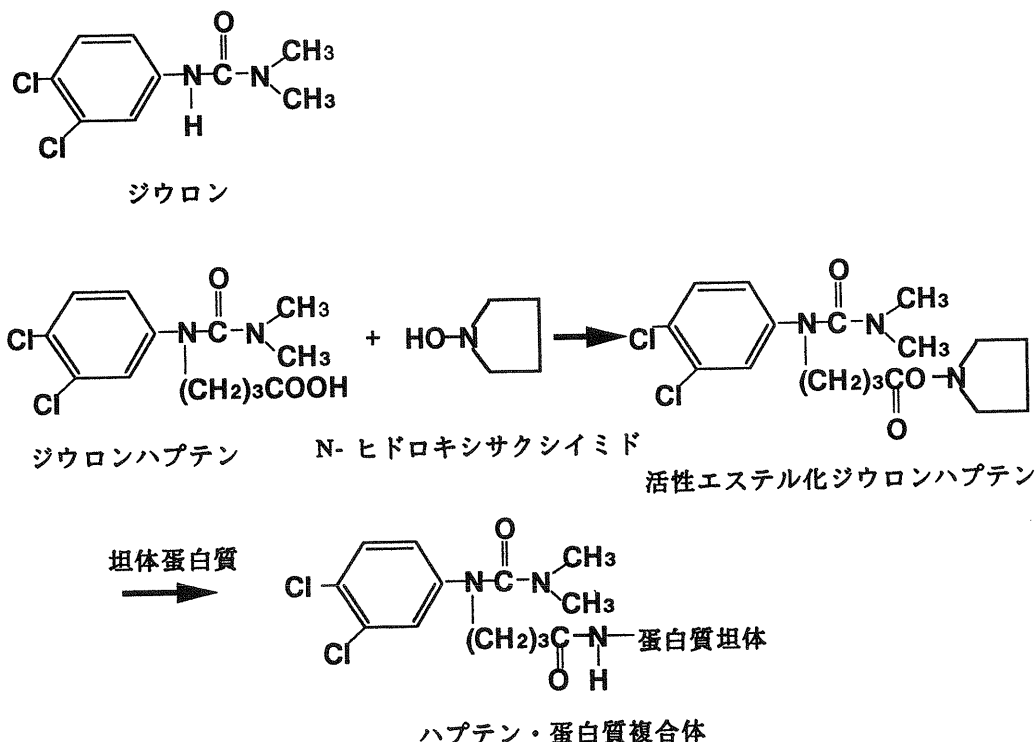


図-1 ジウロンの構造式とジウロンハプテン蛋白質複合体合成の例¹⁶⁾

ブミン (OVA) などの担体蛋白質に農薬の誘導体を結合した複合体を調製してそれを免疫原とする。この際に用いる農薬の誘導体をハプテンと呼び、それと蛋白質担体との結合には種々の方法がある。よく用いられる方法は親化合物にカルボキシル基を導入したハプテンと蛋白質担体を結合する方法である。まず、ハプテンを *N*-メチルモルホリンによって酸無水物とするか、あるいは *N*-ヒドロキシサクシイミドによって活性エステルにして、それらを蛋白質担体の遊離アミノ基とカップリングする。図-1 にジウロン-蛋白質複合体の作製を示した¹⁶⁾。カルボキシル基と親化合物の構造部分間にスパーサーアームとして C 2~5 の炭化水素基を導入して、抗原がよく認識されるようにする。また、尿素の N-H 基を $(CH_2)_3COOH$ 基で置換することにより、分子全体を認識する抗体の作製を意図している。

3. 抗体の作製

ポリクローナル抗体の作製は免疫原 (ハプテン-蛋白質複合体) を含むリン酸緩衝液に等量のフロインドアジュバントを加えて乳化し、0.5~1 mg の免疫原をウサギの背に皮下注射する。2~4 週間の間隔で追加免疫を繰り返し、抗体力価が高くなったところで採血し、抗血清を得る。さらに、抗血清を硫酸塩析するか、あるいは、プロテイン A などのアフィニティーカラムクロマトグラフィーで精製する。モノクローナル抗体の作製はマウスに 50 μ g 前後の免疫原を背中に皮下注射するか、あるいは腹腔内に注射し、抗体力価が高くなったマウスの脾臓を摘出し、脾臓細胞と骨髓腫細胞 (ミエローマ細胞) を融合することによってハイブリドーマを得る。ハイブリドーマはミエローマ細胞がアミ

ノプテリンで生育阻害されることを利用して、アミノプテリンを含む HAT 培地で選抜する。選抜したハイブリドーマの培養上清を用いて抗原と反応する抗体産生のハイブリドーマを選抜する。さらに、農薬によって培養上清と抗原との反応を阻害されるハイブリドーマを選抜する。細胞を限界希釈法で単一のコロニーに単離してクローンを樹立する。選抜されたクローンを培養してその培養液を硫酸塩析によるか、あるいは、プロテイン G カラムクロマトグラフィーで精製してモノクローナル抗体を得る。

モノクローナル抗体は作製に費用がかかるが、抗体価が高い、特異性が高い、使用目的に適した抗体を選抜できる、さらに、選抜したハイブリドーマから安定して抗体を常時供給できる、などの利点がある。

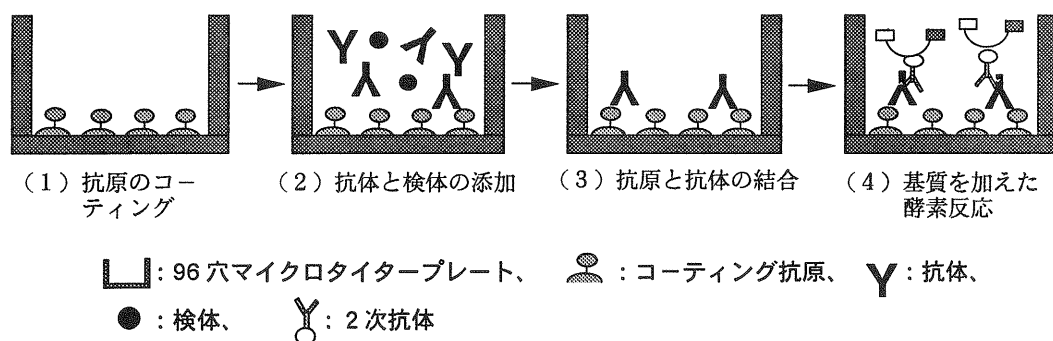
4. ELISA フォーマット

残留農薬の測定によく用いられる ELISA フォーマットは競合阻害法である。これは検体 (農薬) とハプテン-蛋白質複合体が競合して抗体に結合する方法で、ハプテン-蛋白質複合体には免疫原に用いたと同じ抗原か、あるいは、例えば、ハプテン-ウサギ血清アルブミン (RSA) 複合体が使用される。ポリクローナル抗体の場合、免疫原に用いた蛋白質部分を認識する抗体が含まれる可能性があり、非特異的な結合を避けるために担体蛋白質として RSA を使用する。競合阻害法には図-2 に示すように 2 種類の方法がある。

(1) 間接競合 ELISA

96穴マイクロタイタープレート (図-2 A-1) にハプテン-蛋白質複合体 (固定化抗原) を固定化し、そこに検体 (抗原) と抗体を加えて抗体と抗原とを反応させる (図-2 A-2)。

A. 間接競合法



B. 直接競合法

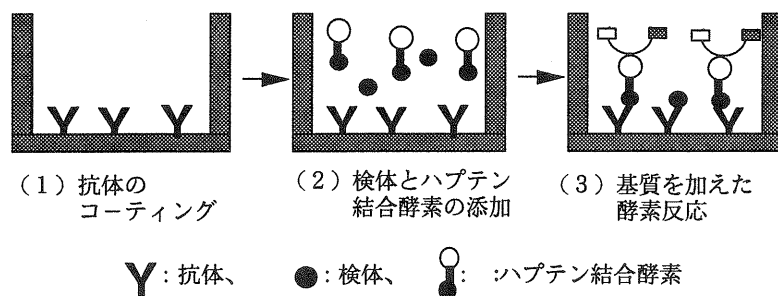


図-2 ELISA の操作手順

そして、固定化抗原と結合しなかった抗体、抗体と結合した検体および抗体と結合しなかった検体を除き、次に、抗体を作製したと同種の哺乳動物の免疫グロブリンによって免疫された、例えば、ヤギ抗体に酵素（ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなど）を結合した酵素抗体複合体（2 次抗体、市販されている）を加え、固定化抗原と結合している抗体に反応させる（図-2 A-3）。未反応の酵素抗体複合体を除き、酵素の基質を加えて発色した酵素反応物（図-2 A-4）の吸光度を測定する。

(2) 直接競合 ELISA

この方法は96系マイクロタイタープレートに抗体を固定化し（図-2 B-1）、前もって調製したハプテンと酵素（ペルオキシダーゼ、ア

ルカリホスファターゼなど）の複合体（酵素標識抗原）と検体（抗原）を加えて固定化した抗体に対して直接競合反応させる（図-2 B-2）。未反応の検体と酵素標識抗原を除き、基質を加えて抗体と結合した酵素によって生じた反応物の吸光度を測定する（図-2 B-3）。

直接競合法は間接競合法に比べて、操作手順が1工程少なく、短時間で分析出来るなどの利点がある。筆者らの経験では一般に直接競合法の方が感度が高い傾向があった。

5. ELISA 標準曲線の作成

検体となる農薬の標品を種々の濃度に調製した標準溶液を用いて、農薬が抗体と抗原の反応を阻害する率を求め、縦軸に阻害率または吸光

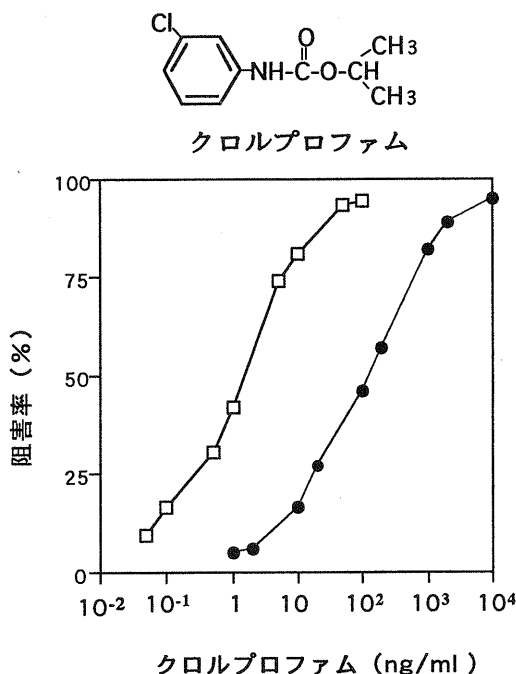


図-3 クロルプロファム抗体のELISA標準曲線

モノクローナル抗体(□),
ポリクローナル抗体(●)

度を示し、横軸に農薬濃度を対数で示した検量線を作成する。一般に、検出限界濃度、グラフで直線性を示す測定可能な濃度範囲、それに、50%阻害を示す濃度(IC₅₀値)などから作製した抗体の適性を評価する。図-3に筆者らが作製したクロルプロファムに対するポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の間接競合ELISAにおける標準曲線を示す。ポリクローナル抗体は、10 ng/ml～1,000 ng/mlの間で測定可能であり、IC₅₀値は120 ng/mlであった。一方、モノクローナル抗体は、0.1 ng/ml～10 ng/mlの間で測定可能で、IC₅₀値は1.6 ng/mlであった。感度においてモノクローナル抗体の方が勝っている。

この標準曲線の作成で、プレートに固定化する抗原の最適濃度、また、抗体あるいは2次抗体の

希釈濃度を定める。測定感度を高めるために、固定化量を少なくし、抗体希釈率を高くすると、吸光度は犠牲となるが測定感度は高くなる。また、固定化抗原を、例えば、担体蛋白質と結合しているハプテン数(ハプテン密度)の異なる抗原や他の担体蛋白質とハプテンを結合した固定化抗原を用いると感度が高くなることもある。

6. 抗体の交差反応性

一般に、抗体は抗原を特異的に認識する。例えば、*p*-ニトロフェノールに対する抗体は*o*-ニトロフェノールと反応しない。この両化合物は化学構造がわずかに異なるからである。しかし、環境試料中に存在する種々の化合物によって農薬と抗体の反応が阻害されることがある。一方、フェノキシ酢酸系、s-トリアジン系の除草剤や有機リン系殺虫剤などは構造の類似した製品が多いので、これらの間で抗体が交差反応性を示すことがある。トリアジン系のメトリブジンの場合、残留基準値はメトリブジンと3種の代謝物の合計値で設定されており、農薬とその代謝物に交差反応性を示す抗体を用いることで、これらを測定することが可能である。また、殺虫剤アルジカルブの酸化代謝物は親化合物と同程度の毒性を示すので、筆者らはこれら両化合物を認識する抗体の作製を進めている。今までに報告されたほとんどの抗体は高い特異性を示したが、特に、モノクローナル抗体では特異性の高い抗体を選抜することが可能である。

7. 残留除草剤の測定

作製した抗体を用いたELISA法が実際に環境試料や農産物の残留農薬の測定に適用できるかどうかを検討する。前述のように、免疫測

定法の開発は水系における除草剤の測定から始まった。飲料水、河川水、地下水、水田水などをサンプリングした水試料に種々の濃度の農薬を添加して回収率を求め、試料による妨害の程度を調べる。水試料の場合はクリーンアップなしで直接測定に供しても、その回収率は満足のいく範囲にあることが多い。許容濃度値がより低く要求される場合、ディスポーザブルのプレパックドカラムを通して濃縮した後にELISAで測定することができる。

次に、風乾した土壌からの添加回収試験の場合、農薬を添加した土壌にメタノールあるいはアセトニトリルを加えて静置後の上清、また、ろ液や遠心分離した上清をバッファーで希釈してELISAで測定する。土壌の性状によって同じ抗体を用いても回収率に差のあることがあるが、それは粘土、あるいは、土壌有機物の含量による影響かどうか、未だ、明らかにされていない。

農産物についてはミルクとオレンジジュースについて測定した報告がある。市販の試料に農薬を添加し、希釈してそのままELISAで測定する。希釈率によって回収率の低い場合があるが、ミルクのような親油性成分を含む試料についても測定が可能である。

農作物の残留農薬の測定では、果物や水分含量の多い野菜では搾取液を希釈して分析するのが最も迅速、簡便な方法である。しかし、農薬は親油性の化合物が多く、脂質を含む組織に分布していると回収が悪くなる。そのために、メタノールあるいはアセトンで抽出した抽出液を希釈して測定する。出来るだけ希釈倍率を下げるために、これらの有機溶媒存在下で安定に反応する抗体が必要となる。実際、メタノールに耐性の抗体が選抜されているし、また、バッフ

ァーにメタノールを加えた方が農薬の溶解度が増して感度が上昇する場合がある。さらに、農薬散布作業者の尿に含まれる残留量の測定や着衣への付着量をパッチ法で測定するのにELISAが用いられ、その測定値がGCあるいはHPLCで確認されている。

これまでに報告された除草剤を抗体を用いて測定した具体例を紹介する。

トリアジン系除草剤はトウモロコシ畑での使用が多く、地下水や飲料水の汚染が問題となっている。Giersch⁵⁾ はアトラジンとプロパジンに対するモノクローナル抗体を作製し、 IC_{50} が0.1 ppbを示す抗体を用いて、0.1 ng/ml ~ 0.5 ng/ml 濃度のアトラジンを水道水、池の水、雨水について測定している。また、Wittmann⁶⁾ らはアトラジンの分解物である脱エチル体と脱イソプロピル体に対して、それぞれ0.2 ppb, 0.28 ppbの IC_{50} 値を持つポリクローナル抗体を用いて、水道水について0.01 ng/mlの脱エチル体を測定している。さらに、Schlaeppli⁷⁾ らは水試料に対し0.05 ng/mlのアトラジンと水酸化アトラジンが測定可能なモノクローナル抗体を用いて、土壌中の水酸化アトラジンをメタノールで抽出してELISAとHPLCで測定した結果、両者の測定法の間で良い相関性があると報告している。

ウレア系除草剤は非農耕地や多くの作物に対して出芽前処理剤として施用されるので、環境中への流出が問題となり報告例も多い。New-some⁸⁾ らはフェニルウレア系のモノリニュロン、ジウロンとリニュロンに交差反応性を示すポリクローナル抗体を作製した。この抗体を使って、ジャガイモ、小麦、オレンジ、ニンジンから40 ng/g ~ 160 ng/gの範囲で測定でき

ると報告している。また, Schneider⁹⁾ らもポリクローナル抗体を用いて, 工業用水, クリークの水, 水道水から $0.1\text{ ng/ml} \sim 10\text{ ng/ml}$ の範囲のモニュロン, ジウロン及びリニュロンの測定が可能であり, ミルクとオレンジジュースでは5倍のバッファーで希釈することによって $0.1\text{ ng/ml} \sim 10\text{ ng/ml}$ のモニュロンとジウロンを測定することが出来たと報告している。

モリネートは水溶性が高く水田に散布されると, 排水口から流出して河川の汚染が問題となった。Gee¹⁰⁾ らは検出限界濃度, 3 ng/ml , $15\text{ ng/ml} \sim 500\text{ ng/ml}$ の範囲で測定可能なポリクローナル抗体を作製している。

2,4-D は飲料水への汚染が心配され, EC 諸国では厳しい許容濃度が設定されている。Franeck¹¹⁾ らはモノクローナル抗体を作製し, $0.2\text{ ng/ml} \sim 10\text{ ng/ml}$ (IC_{50} : 0.8 ng/ml) の範囲で測定が可能であったと報告している。

ウラシル系のプロマシルは果樹園や畑地に広く用いられ, 水系や土壤汚染が問題となった。Bekheit¹²⁾ らは IC_{50} 値が 0.25 ng/ml のポリクローナル抗体を作製して, 水試料で $0.1\text{ ng/ml} \sim 160\text{ ng/ml}$ の範囲で測定可能で, 土壤から1% NaOH水溶液で抽出した液を希釈することによって 40 ng/ml までの濃度の測定が可能であったと報告している。

クロロスルフロンは土壤中に少量でも残存していると後に栽培される作物に影響する。Kelley¹³⁾ らは土壤中のクロロスルフロンをポリクローナル抗体を用いたELISA, HPLCとトウモロコシ根を用いたバイオアッセイ法で測定した結果, 検出限界濃度はそれぞれ 0.1 ppb , 0.2 ppb , 0.1 ppb であり, 短時間で結果の出るELISAが最も優れていると報告し

ている。

最近, Johnson¹⁴⁾ らは2,4-Dと似た作用を示すフルロキシピルとトリクロピルについて, それぞれ測定範囲が $0.1\text{ ng/ml} \sim 10\text{ ng/ml}$ で IC_{50} が 1.6 ng/ml と測定範囲が $0.1\text{ ng/ml} \sim 5\text{ ng/ml}$ で IC_{50} が 1.7 ng/ml のポリクローナル抗体を作製し, この抗体を用いて, 河川水では 0.1 ng/ml , 土壌では 5 ng/ml で残留量の測定が可能であったと報告している。

機器分析に比べて, ELISAによる測定値は大きく変動することがある。Li¹⁵⁾ らは誤差の生じる最も大きな理由として抗体あるいは抗原のプレートへのコーティングが関係しており, プレートの材質によるウェル表面の不均一性のために, ウェルに常に均一に固相化するのがむずかしいことによると考えている。

お わ り に

酵素免疫測定法は臨床検査などで広く用いられてきた。一方, 残留農薬の測定にはこの方法の適用が遅れている。その理由として, 一般に低分子化合物に対するハプテン抗体は特異性がそれほど高くなく, しかも, 脂溶性化合物に対しては, 特に, 抗原・抗体反応が難しいと考えられていたことなどがある。しかしながら, モノクローナル抗体について, 特異抗体を選抜することにより特異性が高く, しかも, 有機溶媒の存在下でも測定できるELISAの確立が可能になった。酵素免疫測定法はまだ開発途上にあり改善工夫する余地が多くあり, 特に, 高感度, 安定性についてはさらに改良する必要がある。モノクローナル抗体は高感度の測定が可能であり, さらに, 蛍光測定により感度の向上が可能である。また, 抗体, 抗原の固定化法の改善により安定した固定化が可能になると思われ

る。さらに測定操作の自動化が可能になるだろう。現在、一部の農薬についてポリクローナル抗体の測定キットが販売されているが、将来より多くの農薬に対する抗体キットが作製され、国の試験・研究機関はもとより、市町村、さらには、農協やマーケットで簡単に残留農薬を測定できるようになることを願うものである。

参 考 文 献

- 1) Funari E., L. Donati, D. Sandroni, and M. Vighi: In 'Pesticide risk in groundwater' ed by M. Vighi and E. Furani, Lewis Publishers, pp 3-44 (1995).
- 2) 丸 論: 千葉県内河川の農薬モニタリング, 「生態化学」**8**, (3), 3-10 (1985).
- 3) Jung, F., S. J. Gee, R. E. Harrison, M. H. Goodrow, A. E. Karu, A. L. Braun, Q. X. Li, and B. D. Hammock: *Pestic. Sci.* **26**, 303-317 (1989).
- 4) Hall, J. C., J. Raymond, A. Deschamps, and M. R. McDermott: *Weed Technol.* **4**, 226-234 (1990).
- 5) Giersch, T.: *J. Agric. Food Chem.* **41**, 1006-1011 (1993).
- 6) Wittmann, C., and B. Hock: *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1194-1200 (1991).
- 7) Schlaeppli, J.-M., W. Fory, and K. Ramsteiner: *J. Agric. Food Chem.* **37**, 1532-1538 (1989).
- 8) Newsome W. H. and P. G. Collins: *Food Agric. Immunol.* **2**, 75-84 (1990).
- 9) Schneider, P., M. H. Goodrow, S. J. Gee, and B. D. Hammock: *J. Agric. Food Chem.* **42**, 413-422 (1994).
- 10) Gee, S. J., T. Miyamoto, M. H. Goodrow, D. Buster, and B. D. Hammock: *J. Agric. Food Chem.* **36**, 863-870 (1988).
- 11) Franek, M., V. Kolar, M. Granatova, and Z. Nevorankova: *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1369-1374 (1994).
- 12) Bekheit, H. K. M., A. D. Lucas, F. Szurdoki, S. J. Gee, and B. D. Hammock: *J. Agric. Food Chem.* **41**, 2220-2227 (1993).
- 13) Kelley, M. M., E. W. Zahnow, W. C. Petersen, and S. T. Toy: *J. Agric. Food Chem.* **33**, 962-965 (1985).
- 14) Johnson, B. D., and J. C. Hall: *J. Agric. Food Chem.* **44**, 488-496 (1996).
- 15) Li, Q. X., S. J. Gee, M. M. McChesney, B. D. Hammock, and J. N. Seiber: *Anal. Chem.* **61**, 819-823 (1989).
- 16) Karu, A. E., M. H. Goodrow, D. J. Schmidt, B. D. Hammock, and M. W. Bigelow: *J. Agric. Food Chem.* **42**, 301-309 (1994).