

植物防疫基礎講座

イムノアッセイ法による農薬の簡易分析とその利用

——拡散と付着量の検定——

たか はし よし ゆき
社団法人日本植物防疫協会研究所 高 橋 義 行

はじめに

省力防除機の開発や少量散布などの防除技術の改善は、経済性、効率性、省力性から農家にとって有効であると同時に、環境に対する負荷を少なくするためにも重要であると考えられる。このような散布技術の向上を図るためには、散布した農薬の付着量や付着の均一性を調べるが必要であり、多数の試料を簡易に測定できる方法が不可欠である。農薬の付着量の測定法としては、スライドグラスなど（葉の代替物）への薬剤粒子の付着状況を顕微鏡を用いて観察する方法や（米山, 1986）、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）やガスクロマトグラフィーなどにより薬剤の有効成分を分析する機器分析法（平松, 1986）が用いられてきた。前者は安価な方法で多数の検定も比較的容易であるが、観察された微粒子がどの程度の農薬成分を含有しているのか判別が困難であることや、スライドグラスと葉などではその付着量が必ずしも一致しないことなどの短所がある（平松, 1986）。一方機器分析法は、高感度・高精度であるが、精製度の高い試料を調製するのに時間と労力がかかり、また高価で特殊な機器と熟練した技術を必要とするため、多数の試料を検定するのは困難である。

より迅速、簡便、安価に多数の試料測定を行う方法として、農薬に対する抗体を利用したイムノアッセイ法が開発されてきた（LESNIK, 1994; MEULENBERG et al., 1995）。イムノアッセイ法は、その農薬に特異的な抗体を用いることで、比較的精製度の低い試料の中から目的とする成分のみを特異的に検出することが可能である。本稿では、イムノアッセイ法を用いて実際に散布された試料からの農薬の検出を行った例を示し、本法利用の可能性を紹介する。

I イムノアッセイ法による測定原理

農薬検定用のイムノアッセイ法は、酵素（ペルオキシダーゼなど）の反応量の多少をもとに判定する ELISA

Immunoassay for Simple Analysis of Some Pesticides and ies Utilization—Determination of Deposition of Pesticides—
By Yoshiyuki TAKAHASHI

（enzyme-linked immunosorbent assay）法の一種である。植物ウイルスなどの巨大分子の検定に利用される非競合法の ELISA 法と異なり、農薬などの低分子を検出するためには、競合法と呼ばれる ELISA 法が用いられる。競合法にも種々の方法が開発されているが、ここでは一抗体固相法（遠藤・宮井, 1987; MEULENBERG et al., 1995）の概略を示す（図-1）。本法は、まず一定量の特異抗体をマイクロプレートやビーズなどの固相に吸着させる（固相化抗体）。次に、一定量の酵素標識抗原（酵素に農薬成分を結合させたもの）と試料中の農薬成分とを固相化抗体に競合的に反応させる（抗原抗体反応）と、その混合比率で結合する。遊離の酵素標識抗原と遊離の農薬成分を除去（B/F 分離）したのちに、固相化抗体に結合した標識物の酵素と基質を反応、発色させ吸光度を測定する。本法では検定試料中の農薬成分が多くなるにしたがって結合する酵素数が少なくなり、発色程度も低くなる。

本稿では、固相として磁性体微粒子を用い、磁石を利用して B/F 分離（洗浄）を行う ELISA（RUBIO et al., 1991）キットを供試した（図-2）。マイクロプレートを固相として用いた場合、ウェル（固相）間の反応容量にバラツキが生じやすく、検定に支障を来すことが考えられる。これに対して磁性体微粒子を用いた場合、そのようなバラツキは軽減され、より短時間の反応で測定できる利点があると考えられる（遠藤・宮井, 1987; RUBIO et al., 1991）。以下、クロロタロニル（TPN）検出用及びベノミル/カルベンダゾール（MBC）検出用の市販の ELISA キット（RaPID Assays, Ohmicron 社, USA）を用いて、筆者らが行った TPN 及び MBC の分析測定の試験例（高橋ら, 1995; TAKAHASHI et al., 1995）を紹介する。

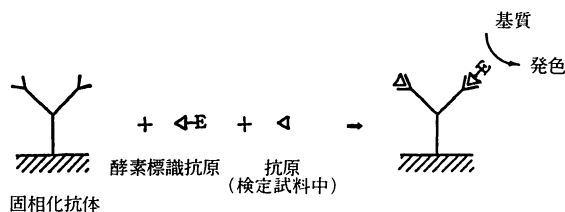


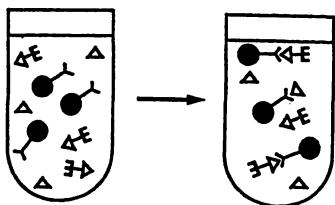
図-1 一抗体固相法の概略

II TPN の検出 (TAKAHASHI et al., 1995)

1 試験概要

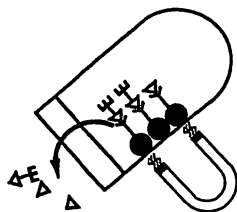
常温煙霧散布及び静電式常温煙霧散布 (小野, 1994)

●抗原抗体反応(室温で15～30分)



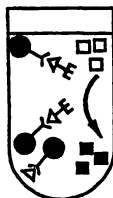
a

●洗浄(2回)



b

●発色反応(室温で20分)



c

図-2 測定の手順

- 磁性体コーティング抗体
- △ 酵素標識抗原
- △ 抗原(農薬)
- 発色基質
- 発色物

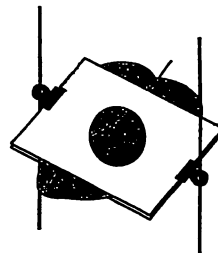
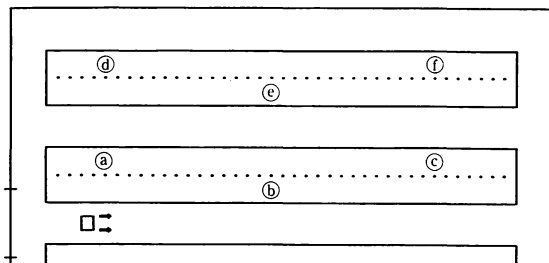


図-3 ナス施設栽培内の調査地点 (a～f) と各地点における片面(表または裏)を露出させた調査葉

による TPN の施設内での拡散や葉の表裏への付着効率を ELISA キットを用いて検討した。各 200 m² のナス栽培施設の中央入口付近に各煙霧機を設置し、40%フロアブル剤の 20 倍希釈液を 1 l ずつ散布した (1,000 倍希釈液の 250 l/10 a に相当)。調査葉は、片側 2 畝中の 6 地点 (a～f) の上位葉 (150 cm)、中位葉 (100 cm)、下位葉 (50 cm) のそれぞれの葉 2 枚を選び、2 枚の厚紙のうち、1 枚の中心部を円形 (径 5.5 cm) に切り抜いた厚紙を用いて葉の片面 (表側または裏側) の一部が露出するように上下に挟んで被覆した (図-3)。静電式常温煙霧機 (KLV 901 EF, 共立) は、噴頭ノズルに荷電リングが取り付けられており、薬液が飛び出すときに静電気を帯電させることにより、通常の常温煙霧より植物への薬剤の付着が良好になるのではないかと期待されている (浅野, 1986; 小野, 1994)。試験では本機の荷電リングへの電気を切って通常の常温煙霧散布にも供試し、TPN の付着効率を比較した。

煙霧散布の翌日に、片面だけ露出させた各葉から径 5 cm のディスクを打ち抜き 1 枚ずつ 2 枚重ねのポリ袋に入れ、それぞれに 10 ml のメタノールを添加 (0.5 ml/cm²) したのち、手に持って 1 分間激しく振とうして抽出した。抽出液は -80℃ に保存し、蒸留水で希釈して分析に供試した。また、中位葉については HPLC でも検定し、イムノアッセイ法による結果と比較した。

2 分析方法

本キットは 0.1～5.0 ppb 程度の濃度範囲で適正な検出が可能である。したがってこの範囲に収まるように試料 (抽出液) を希釈 (50～8,000 倍) して検定に供試した。ELISA (RUBIO et al., 1991) はキットの手順に従った。まず付属の TPN 希釈液 (0.0, 0.1, 1.0, 5.0 ppb) 及び検定試料 (希釈した抽出液) を小試験管に 200 μl ずつ分注し、これに酵素 (ペルオキシダーゼ) 標識抗原を 250 μl ずつ添加する。さらに磁性体微粒子に固相化した抗体を 500 μl ずつ添加し、室温で 30 分間静置する (図-2 a)。次に磁石ユニットを用いて磁性体微粒子を集め、液

だけを除去する (図-2 b)。さらに付属の洗浄液を用いて洗浄後、磁石ユニットをはずして発色基質 (TMB) 500 μl を分注する。室温で 20 分間静置して発色するのを待ち、最後に反応停止液 (0.5% 硫酸水溶液) 500 μl を添加して呈色反応を停止させる (図-2 c)。反応の程度は吸光度 (450 nm) から読み取る。

実際の分析測定の一例を表-1 及び図-4 に示した。既知濃度の TPN (0.0, 0.1, 1.0, 5.0 ppb) での発色程度を吸光度で測定し、0.0 ppb での値に対する割合 (% B/Bo) を算出してこれをグラフ上にプロットして検量線を描く。未知の濃度の試料は希釈して 2 濃度以上を同時に測定する。例えば 1,000 倍, 2,000 倍, 4,000 倍と 3 濃度に希釈して測定した場合、その吸光度が 0.305, 0.382, 0.472 となり対照区の吸光度に対する割合は 40%, 50%, 62% で、検量線上にプロットするとそれぞれ 1.18 ppb, 0.62 ppb, 0.30 ppb と読み取れた (図-4)。したがって元の濃度は、1.18 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1.24 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となり (表-1)、この試料 (葉片) に付着していた TPN の付着量は平均で 0.605 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (平均値 1.21 $\mu\text{g}/\text{ml} \times 0.5 \text{ ml}/\text{cm}^2$) となった。この測定は 1~2 時間で完了した。

表-1 イムノアッセイ法による TPN の分析測定

検体試料	吸光度 (450 nm)	B/Bo (%)	測定値 (ppb)	試料中の濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
0.0(ppb, TPN)	0.762	—	—	—
0.1(ppb, TPN)	0.606	80	—	—
1.0(ppb, TPN)	0.321	42	—	—
5.0(ppb, TPN)	0.140	18	—	—
試料(1,000 倍) a	0.305	40	1.18	1.18
(2,000 倍) b	0.382	50	0.62	1.24
(4,000 倍) c	0.472	62	0.30	1.20

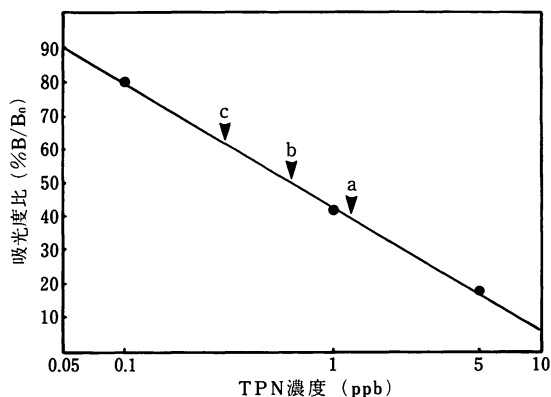


図-4 イムノアッセイ法による TPN の検量線と測定値

このようにイムノアッセイ法による測定では、毎回検量線を作成して試料中の TPN 濃度を読み取り、希釈倍数を考慮して元の試料中の TPN 量を算出する。

3 再現性と信頼性

イムノアッセイ法による測定結果は酵素の反応量に依存するため同一試料を検定した場合でも、その結果は毎回微妙に異なってくる。本法の再現性をみるため、0.75 ppb の TPN 溶液を供試してこれを 15 回繰返し検定した結果、本試験では 0.60 (87%) ~0.85 ppb (113%) で、その平均は 0.73 ppb (97%) であった。

さらに ELISA と HPLC による測定値を 16 個の検定試料について比較した結果、スロープは 1.26 で ELISA での値の方がやや高めであったが、相関係数は 0.987 で両者の結果には強い相関関係が認められた (図-5)。

以上の結果からイムノアッセイ法による TPN の分析は、再現性と信頼性があると判断された。

4 拡散と付着量の測定

施設内の各地点での付着量の測定結果から TPN の水平拡散を示したのが図-6 である。各地点での数字は、上・中・下位葉への付着量の平均を四捨五入したもので示した。図にみられるように葉の表側では、常温煙霧区と静電式常温煙霧区には顕著な差は認められなかった。一方、裏側では、静電式常温煙霧区のほうがより多くの薬剤が付着しているのが明らかになった。また常温煙霧区の⑤地点で (図-3 参照) 異常に高い値がでたが、これ

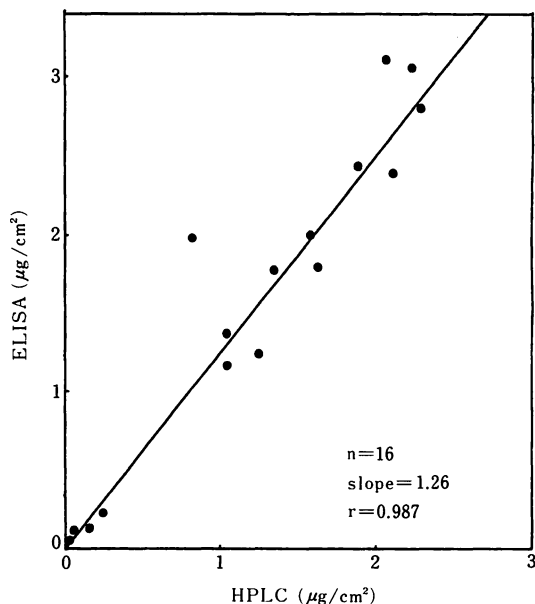


図-5 ELISA と HPLC による測定結果の相関関係 (TAKAHASHI et al., 1995)

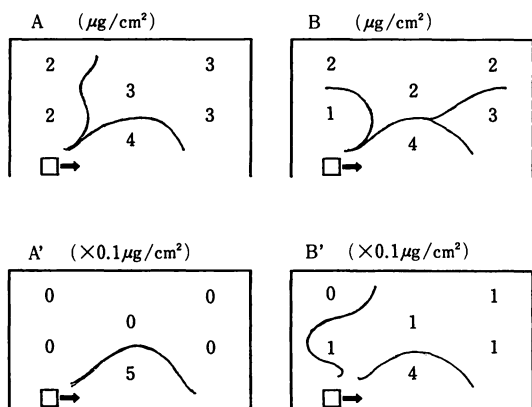


図-6 TPN の施設内拡散

A (葉表面), A' (葉裏面) : 常温煙霧散布

B (葉表面), B' (葉裏面) : 静電式常温煙霧散布

(TAKAHASHI et al., 1995)

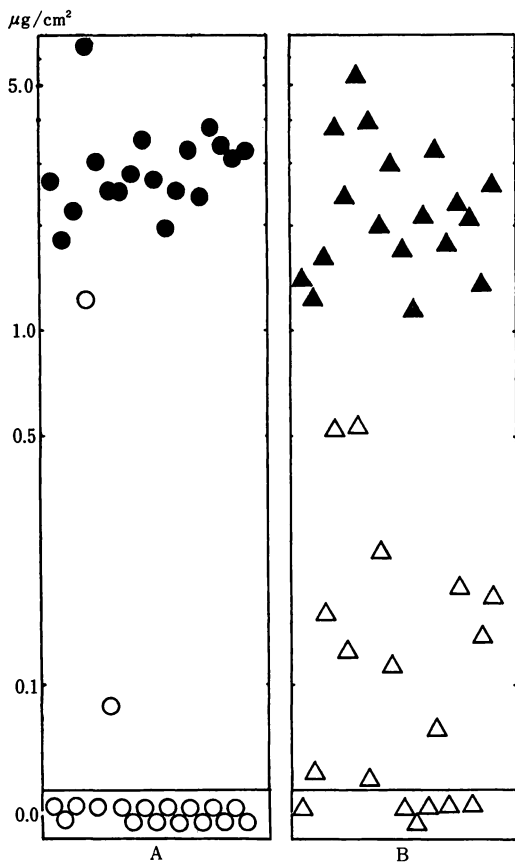


図-7 各葉面の表裏における TPN の付着量

●, ▲ : 葉面表 ○, △ : 葉面裏

A : 常温煙霧散布

B : 静電式常温煙霧散布

(TAKAHASHI et al., 1995)

は噴霧液が直接当たったためと考えられる。このように本法を用いて両煙霧による TPN の施設内拡散の程度を容易に調査することが可能であった。

さらに両煙霧法の付着効率を比較するために全試料 72 点の検定結果を図-7 に示した。葉の表側への付着は両煙霧ともに同程度であった。一方葉裏側では、常温煙霧区では直接噴霧液が当たったと思われる 2 点以外は葉の裏側への付着はほとんど認められなかった。これに対して静電式常温煙霧区では葉の裏側へも付着が認められ、静電気付加の効果 (浅野, 1986; 小野, 1994) によるものと推察された。このようにイムノアッセイ法は、この二つの煙霧法の評価にも利用できることが判明した。

III MBC の検出 (高橋ら, 1995)

1 試験概要

施設栽培の収穫後期のトマト (品種: 桃太郎) に、ベノミル水和剤の 2,000 倍希釈液及び 3,000 倍液の散布区を設け、背負式自動噴霧器を用いて 250 l/10 a の割合で慣行散布した。散布の翌日, 3 日後, 7 日後に果実をそれぞれ 5 個ずつ収穫して検定に供試した。いずれの果実も 1 個当たり 200 g 重前後のものを選んで収穫した。

収穫した果実は縦に細断して 1 片 25 g を切り取り、これに 50 ml のアセトンを加えて 2 分間ブレンダーで磨砕した。この磨砕液から約 25 ml を取り, 3,000 rpm で 5 分間遠沈後, 上清を 100 μl ずつ 2 組のマイクロチューブに移し, アセトンを蒸発させて乾燥抽出物を得た。これに 100 μl の滅菌蒸留水を加えて溶解し, 希釈 (10~2,000 倍) して検定試料とした。

2 再現性

既知濃度 (2.5 ppb) の MBC 溶液を用いて検定を 10 回繰返しその再現性を検討した結果, 測定値は 2.3 (92%) ~2.8 ppb (112%) で, その平均は 2.59 ppb (104%) であった。したがって, MBC の測定においても各検定間の差は少なく本法の再現性は高いと考えられた。

3 MBC の測定

ベノミルは有機溶媒中で不安定であることから, 本実験のアセトンを用いて抽出した試料から検出されたものは MBC と判断した。2,000 倍希釈液の散布区内及び 3,000 倍希釈液の散布区内のトマト果実間では, 図-8 に示すように検出された MBC の濃度は大きく異なっていた。これは同一区内で薬剤が良く付着した果実と付着の悪い果実があることを意味し, 散布むらがあったことを示している。本実験では株全体に薬液がかかるように心掛けて散布したが, 果実を対象とした散布を行っていないので, 結果的に果実ではこのような MBC 濃度になっ

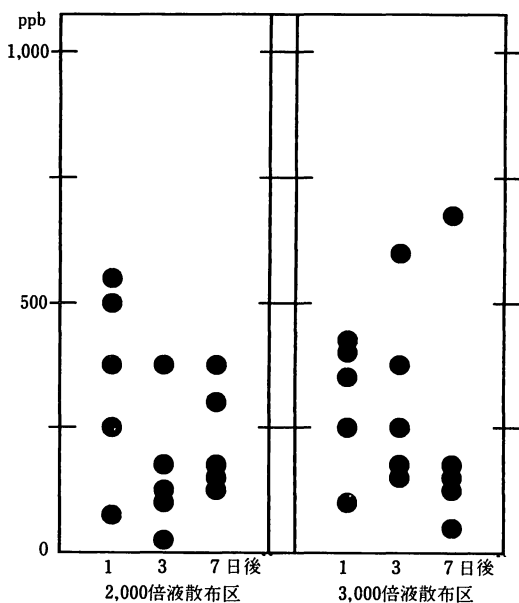


図-8 各ペノミル水和剤散布区から収穫したトマト果実からの MBC の検出濃度 (ppb)

●は個々の試料の MBC 濃度を示す (高橋ら, 1995)

たとえられる。

お わ り に

以上のように本稿では、イムノアッセイ法が短時間に簡単な操作で多数の試料から特定の農薬成分を分析測定できることを示した。従来の機器分析法は病害虫の専門家が手軽に行えるというものではなかった。これに対してイムノアッセイ法は病害虫防除の研究者によって農薬の動向を real time で分析することが可能になる。これは農薬の効果的な利用を図るうえでも望ましいことであり、今後の防除技術の向上に役立つものと考え。

学 界 だ よ り

○第 13 回「植物保護とバイオテクノロジー」シンポジウムの開催

主 催：日本農薬学会

日 時：平成 7 年 10 月 27 日(金) 10:30～

場 所：〒606 京都市左京区吉田河原町 15-9

京大会館 Tel 075-751-8311

参加費：4,000 円 (学生 2,000 円)

プログラム：

「ゼニゴケ細胞を用いた光要求型除草剤の作用機構解析」(サントリー・生物医学研究所) 田中隆治氏
「今注目されるマルハナバチー日本在来種の実用化の可能性」(玉川大・農) 小野正人氏
「環境汚染物質分解菌の進化工学的育種」

また海外、特にアメリカにおいては、環境汚染物質(農薬を含む)の食品(農産物)への残留、地下水や土壌の汚染などの検定は年々増えて大きなマーケットになるうとしている(International Association of Environmental Testing Labs では 1992 年で約 23 億ドル、95 年では約 30 億ドルと推定している)。そのような背景の中で比較的安価にそして短時間に多数の試料を検定可能なイムノアッセイ法に関心が高まっている。アメリカ環境保護庁(EPA)でもその有効性を認め、積極的な適用を図っている例(農薬)もあるようである(LESNIK, 1994)。このため本法による分析可能な農薬の種類も年々増えてきている(現在は 30 種類前後)。

一方わが国においては、現在このようなキットを開発・作製しているところはなく、輸入されたキットが市販されているだけである。農薬に対する抗体の作製には、農薬に対する知識、化学合成の技術、免疫学の知識と技術などを総合的に必要とする。平成 7 年の日本農薬学会大会において神戸大及び東京農大の二つのグループからそれぞれ殺虫剤に対する抗体の作製とその特異性が報告されたが、欧米などと比べるとまだ始まったばかりといえよう。今後、種々の薬剤に対する抗体が作製され、手近に利用できるようになることを期待したい。

引 用 文 献

- 1) 浅野和俊(1986): 植物防疫 40: 114～119.
- 2) 遠藤雄一・宮井潔(1987): 蛋白質核酸酵素, 別冊 31: 13～26.
- 3) 平松禮治(1986): 植物防疫 40: 103～108.
- 4) LESNIK, B (1994): Environ. Lab 6(3): 37～44.
- 5) MEULENBERG, E. P. et al. (1995): Environ. Sci. Technol. 29: 553～560.
- 6) 小野盾男(1994): 植物防疫 48: 219～222.
- 7) RUBIO, F. M. et al. (1991): Food Agric. Immunol. 3: 113～125.
- 8) 高橋義行ら(1995): 関東病虫研報 投稿中.
- 9) TAKAHASHI, Y. et al. (1995): J. Pesticide Sci. 投稿中.
- 10) 米山伸吾(1986): 植物防疫 40: 109～113.

(九大・農) 古川謙介氏
「植物の防御戦略と共生：植食者の天敵を利用する植物」(京大・農) 高林純示氏
「C4 光合成の炭酸固定酵素：分子進化とリン酸化を介する活性の光調節」(京大・農) 泉井 桂氏
参加申込：9 月末までに氏名、連絡先住所、電話・FAX 番号を明記し、下記にお申し込みください。
申込先：〒351-01 和光市広沢 2-1
理化学研究所微生物制御研究室 鎌倉高志氏
Tel 048-462-1111 (内 5514)
FAX 048-462-4676
問合先：上記申込先、または
〒606 京都市左京区下鴨半木町 1 丁目 5 番
京都府立大学 農学部 植物病理学研究室 久 保康之氏 Tel (FAX) 075-702-0957