

モノクローナル抗体を用いた殺菌剤クロロタロニルに 対する酵素免疫測定法の開発

山口 (村上) 友貴絵, 小川加那子, 伊東 茂寿*, 成田 宏史

Development of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Germicide Chlorothalonil with a Monoclonal Antibody

Yukie Murakami-Yamaguchi, Kanako Ogawa, Shigehisa Ito and Hiroshi Narita

Chlorothalonil (tetrachloroisophthalonitrile) is a compound which has been widely used as germicide. A competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed for the detection of residual chlorothalonil in crops. Three monoclonal antibodies, mAbs 12E, 9A, and 11D were generated against bovine serum albumin-conjugated pentachlorophenol as a homologue of chlorothalonil. By using these mAbs, a direct competitive ELISA has been done. Detectable range of chlorothalonil in the ELISA was 1-3 ng/ml for mAb 12E and 0.3-3 ng/ml for both mAbs 11D and 9A. MAb 9A reacted with chlorothalonil 3 times stronger than another structurally related germicide fthalide, while mAb 11D reacted with fthalide 5 times stronger than chlorothalonil. The proposed ELISA with mAb 9A would be useful for convenient monitoring of residual chlorothalonil in crops.

(Received September 3, 2005)

1. 緒 言

近年、ダイオキシンや内分泌攪乱物質、残留農薬などによる環境や農畜産物などへの汚染の拡大が懸念されている。とりわけ残留農薬については、中国輸入野菜からの検出や、国内での無登録農薬の使用などの問題を背景に、農薬取締法の改正や農作物のトレーサビリティシステム開発、導入などが検討され、食の安全・安心に対する関心が高まっている。

現在、残留農薬に対する分析は公定法に基づく高速液体クロマトグラフィー¹⁻⁵⁾、ガスクロマトグラフィー⁶⁻⁹⁾などの機器分析が主流であるが、これらは高価な機械と高い維持費、熟練技術者が必要で、しかも前処理にも時間がかかるという欠点がある¹⁰⁾。これに対して抗原抗体反応を利用した免疫化学的測定法 (ELISA 法) は迅速、簡便かつ安価な方法として期待されている¹¹⁻¹⁴⁾。しかし、これまで国

内で使用されてきた残留農薬の ELISA 法キットはすべて輸入品であり、水質、土壌を中心とした海外の需要に合わせて開発されているため、国内の規制に合致する項目は限定され、ほとんど実用化に結びつかなかった。さらに ELISA 法による定量法を確立するには個々の農薬に対する特異抗体を作製することが必要であり、そのためには高度な技術と多大な時間を要する。これらのことを背景に、近年海外からのキットの輸入も、国内での開発も行われていなかった。

また、これまでの市販 ELISA キットはポリクローナル抗体を用いた定量系が主流であった。しかし、ポリクローナル抗体は免疫抗原に対する性質の異なる様々な抗体の集団であり、免疫動物の個体差により、全く同じ性質の抗体を得ることは困難である。一方、モノクローナル抗体は、単一の細胞集団由来の抗体であるため、抗体産生細胞が生きている限り半永久的に均質な抗体を得られる利点がある¹⁵⁾。このようなモノクローナル抗体の性質は、食の安全・安心と言ったグローバルスタンダードの要求される

京都女子大学食物栄養学科食品学第一研究室

* (株) ホリババイオテクノロジー

評価系を構築する上で極めて重要な特質である。

本研究では一般的に広く使用されている有機塩素系の農薬であるクロロタロニルに対するモノクローナル抗体を作製し、その免疫学的定量系の確立を試みた。

II. 試料および方法

1. 試料

クロロタロニル (2, 4, 5, 6-テトラクロロ-1, 3-ベンゼンジカルボニトリル), ペンタクロロフェノール (PCP), PCP-カルボキシル誘導体, テクロフサラム, フサライド, テトラジホン (図 1), シアゾファミド, シモキサニル, ベノミル, プロシミドン, オキサジキシル, イプロジオン, ペルメトリン, オキシシン銅, アゾキシストロビン, メタラキシルは (株) ホリババイオテクノロジーより供与いただいた。

参考: クロロタロニルはアメリカのダイヤモンド・アルカリによって開発された殺菌剤で、園芸作物の病害に広い適用を持ち、有機硫黄殺菌剤や銅殺菌剤に似た効果がある。保護作用を中心とした殺菌剤として用いられる。予防効果が高く、耐雨性があり、水によって流出しにくい。酸、アルカリ、熱及び紫外線にも安定で残効性が強い。ニトリル基 (-CN) が病原菌の原形質や酵素の SH 基に作用すると考えられる。登録保留基準は果実、野菜、芋類、テンサイ、茶について 1 ppm だが、残留基準はない。一般の研究機関からの分析報告に対して検出数が多く、セロリ、ミツバ、サニーレタスなどで高濃度の検出が報告されている。特に軟弱野菜での報告が多い。ハウス栽培や集中的な栽培で使われるくん蒸剤の残留であることが多いと考えられる。人体中毒症状としては、皮膚かぶれ、気管支喘息様発作、眼の結膜炎などがある。アメリカ科学アカデミーにより発ガン性が指摘されている。魚介類に対しての毒性が比較的強い¹⁶⁾。

2. 方法

モノクローナル抗体の作製を初めとする免疫学的手法に関しては、基本的に森下と成田の方法¹⁵⁾に従った。

1) ハプテン化抗原の作製

PCP-カルボキシル誘導体をカルボジイミドを用いた活性化エステル法により、ウシあるいはウサギ血清アルブミン (BSA または RSA) と結合させた。また、ペルオキシダーゼ標識PCPも同様に作製した。

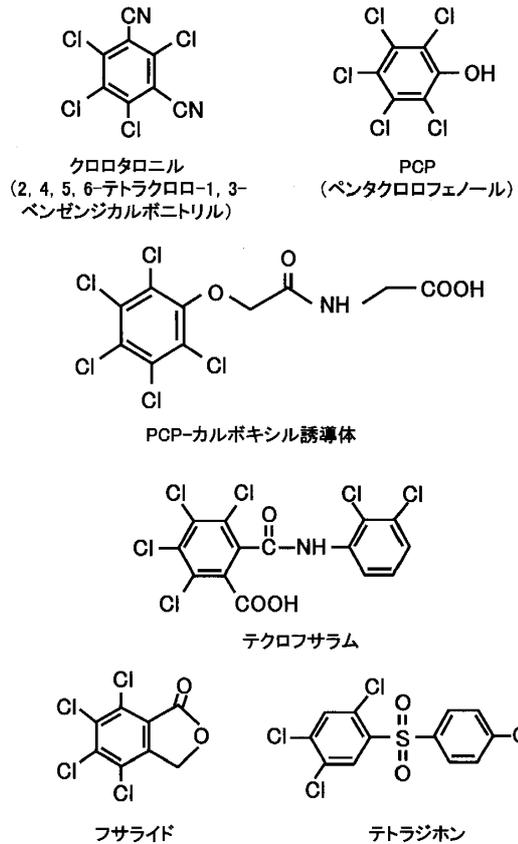


図1 化合物の構造
本研究で使用した化合物の構造を示した。

2) 免疫

6-8 週令の 3 匹の雌 BALB/c マウスの腹腔内に抗原として PCP-BSA 100 μ g と完全フロイントアジュバント (Freund's complete adjuvant, Difco 社製) とのエマルジョン (1 容 : 1 容) を投与した。2 週間後、上述抗原 50 μ g と不完全フロイントアジュバント (Freund's incomplete adjuvant, Difco 社製) とのエマルジョン (1 容 : 1 容) を腹腔内に投与し、さらに 2 週間後抗原 25 μ g を含む PBS (150mM 塩化ナトリウムを含む 10mM リン酸緩衝液 pH7.4) を腹腔内に投与した。その 3 日後にマウスを屠殺し、脾臓を摘出してこれをほぐし、基本培地 (RPMI-1640 培地に 100mM ピルビン酸ナトリウム、結晶ペニシリン G カリウム 1 万単位/l, ストレプトマイシン 10 mg/l を加えた培地) に懸濁した後、脾臓細胞を遠心分離で回収した。

3) 細胞融合とHAT選択

前述で調製した脾臓細胞と 10%ウシ胎仔血清添加基本培地 (以下、血清添加培地と記す) で培養し

対数増殖期のマウスミエローマ細胞 P3U1 を 10 : 1 の比率になるように混合し、基本培地で 2 回洗浄した。遠心分離により細胞を回収し、細胞ペレットに平均分子量 1500 の 50% ポリエチレングリコール溶液 (ロシュ社製) 1ml を 1 分かけて添加し、その後 1 分間静置した。さらに 20mL の基本培地を 10 分間かけて添加し、細胞液を希釈した後、遠心分離により細胞を回収した。この細胞を 40mL の HAT 培地 ($4 \times 10^{-7}M$ アミノプテリン, $1.6 \times 10^{-5}M$ チミジン, および $1 \times 10^{-4}M$ ヒポキサンチンを含む血清添加培地) に懸濁し、96 穴プレート 4 枚に分注し、湿度 100%, 炭酸ガス 5%, 37°C で培養を開始した。培養開始の翌日, HAT 培地を各ウェルに 100 μ l 添加し、以後 2 ないし 3 日ごとに半量の培地を新たな HAT 培地と交換し、培養を続けた。その結果、ほとんどのウェルでハイブリドーマの増殖が認められた。

4) 抗体産生細胞の樹立

細胞融合後、得られたハイブリドーマから目的とする抗体産生細胞を選択するため、固相 ELISA と間接競合 ELISA によりスクリーニングを行った (図 2)。すなわち、前者は PCP-RSA を 5 μ g/ml 固相化後 1%BSA/PBS によりブロッキングし、一次反応としてハイブリドーマ培養上清を反応させ、続いてアルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG (カッペル社製) との反応後、 p -ニトロフェニルリン酸二ナトリウムにより検出し、405nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (Model 3550, Bio-Rad 社製) を用いて測定した。後者は PCP-RSA を固相化ブロッキング後、一次反応として遊離競合因子化合物 (クロロタロニル) と培養上清とを同時に反応させ、続いて固相 ELISA と同様に検出した。担体を BSA から RSA に変えたのは、BSA に反応する抗体を除く

ためである。

5) ハイブリドーマのクローニング

限界希釈法により 2 回のクローニングを行った。増殖培地として血清添加培地に増殖因子として ORIGIN (IGEN 社製の B 細胞増殖因子を含む溶液) を 10% になるように添加したものをを用いた。

6) モノクローナル抗体サブクラスの決定

モノクローナル抗体産生細胞株が培養上清液中に分泌するモノクローナル抗体について、その免疫グロブリンのサブクラスを、マウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット (アマージャム社製) を用いて調べた。

7) 抗体の大量調製

BALB/c マウスに腹水癌を誘導するために 0.5ml のプリスタンを腹腔内に投与し、投与 3 ~ 10 日後に 1×10^7 個のモノクローナル抗体産生細胞を腹腔内に移植した。その約 2 週間後に腹水を採取した。

8) 抗体の精製

採取した腹水を遠心分離後 (10000 \times g, 4°C, 5 分), 上清を採取し、プロテイン G セファロース (アマージャム社製) を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより純化した。

9) ELISA

図 2 に 3 つの ELISA 法について示した。固相 ELISA, 間接競合 ELISA については、先に述べた。直接競合 ELISA は、精製抗体を 5 μ g/ml で固相化後、ブロッキングし、ペルオキシダーゼ標識 PCP と遊離の競合化合物とを同時に反応させ、続いて 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジンにより室温で 20 分間反応させ、1N 硫酸 100 μ l 添加により反応停止を行い、450nm における吸光度を測定した。

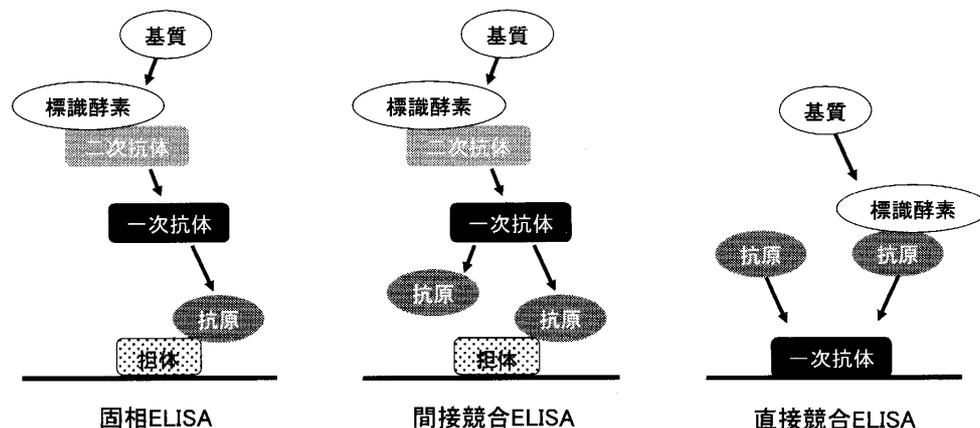


図 2 ELISA 法の概略

表 1 スクリーニング結果

		マウス No.		
		1	2	3
細胞融合後 スクリーニング	実施 well	104	384	384
	陽性 well	2	12	4
1次クローニング後 スクリーニング	実施 well	0	1	3
	陽性 well	0	1	3
2次クローニング後 スクリーニング	実施 well	0	1	3
	陽性 well	0	1	2

各段階における ELISA によるスクリーニングの結果を well の個数で示した。

III. 結果および考察

1. モノクローナル抗体の作製

一般にクロロタロニルのような低分子化合物（分子量 1 万以下）は抗体とは結合し得るが、免疫応答を誘導できない。このため、特異抗体を得るためには免疫原性の高い高分子担体（通常タンパク質）に結合させて抗原とする必要がある。しかし、クロロタロニルはタンパク質と結合させ難いため、クロロタロニルと構造の類似した PCP にカルボキシル基を導入し、これを BSA に結合させて抗原とし、マウスを免疫した。

免疫マウスの脾臓細胞とミエローマ細胞を融合後 ELISA によるスクリーニングを行った結果、872 ウェル中 18 ウェルが陽性であった（表 1）。これら抗体産生陽性ウェル中の細胞をクローニングし、最終的に 12E, 9A, 11D の 3 つのモノクローナル抗体産生株を樹立した。その後、プリスタン処理マウスに細胞を腹水ガン化し、腹水を採取した。それらの細胞が産生する抗体のクラス決定を行った結果、全て IgG1 であることが確認できたので、採取した腹水からプロテイン G による抗体の純化を行い IgG 画分を回収した。図 3 に 12E の溶出パターンを示した。腹水 1 ml を 20 mM リン酸緩衝液 pH 7.0 により 2 倍希釈後、1 ml のカラムにアプライし、リン酸緩衝液により残りの素通り画分を溶出させ、次に 0.1 M グリシン-塩酸緩衝液 pH 3 を用いて吸着画分を分取した。回収した画分を PBS に対して透析し、固相 ELISA により抗体活性を確認後、4°C で保存した。腹水 1 ml あたり約 1.5 mg の精製抗体が得られた。また、カラム処理後の抗体について SDS-PAGE による純度検定を行った（図 4）。吸着画分に精製抗体の IgG の重鎖と短鎖があること、夾雑物がないことが

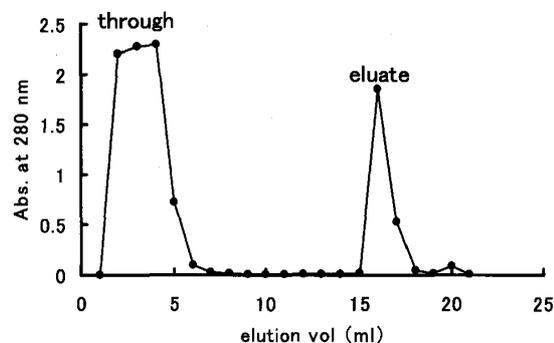


図 3 プロテイン G による腹水からの IgG 画分の単離

12E の腹水 1 ml を 20 mM リン酸緩衝液 pH 7.0 により 2 倍希釈後、1 ml のプロテイン G カラムにアプライし、リン酸緩衝液により残りの素通り画分を溶出させた。次に 0.1 M グリシン-塩酸緩衝液 pH 3 を用いて吸着画分を分取した。

確認できた。9A, 11D についても、同様の結果であった。

2. ELISA の構築

クロロタロニルの水に対する溶解度は 25°C において 0.81 mg/l であり、水に対して難溶である。従って、農作物からの抽出においてはメタノールのような有機溶媒による抽出操作が必要である。つまり抗体も有機溶媒耐性が必要となる。既存の農業検出キットにおける抽出溶媒はメタノールが使用されていることから、本研究においてもメタノールを選択し、まず、メタノールが抗クロロタロニルモノクローナル抗体に与える影響について調べた。既存キットではメタノール抽出液を水で 10 倍希釈して 10% メタノール共存下において ELISA に供しているため、その条件下で固相 ELISA を行ったところ、3 つの抗体のいずれもがメタノール非共存下と同程度の活性

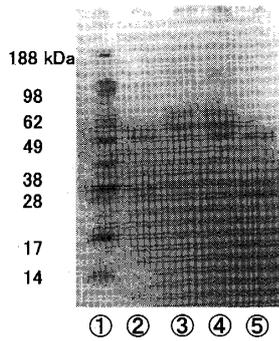


図 4 精製抗体の純度検定
10%均一ゲル還元剤存在下において図 3 における試料の SDS-PAGE 分析を行った。
①: 分子量マーカー, ②: マウス IgG マーカー, ③: apply(10 μ g/lane), ④: through(5 μ g/lane), ⑤: eluate(5 μ g/lane)

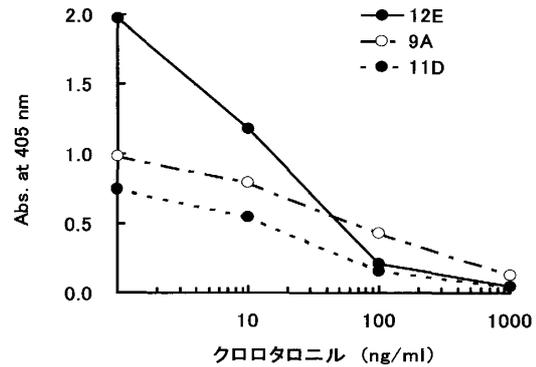


図 5 モノクローナル抗体の間接競合 ELISA における反応性
PCP-RSA を固相化し、遊離抗原としてクロロタロニルおよび一次抗体としてハイブリドーマ培養上清を同時に反応させ、アルカリホスファターゼ標識抗マウス IgG との反応後、 p -ニトロフェニルリン酸二ナトリウムにより検出し、405nm における吸光度を測定した。

を示すことが確認できた。

次に問題となるのは感度である。クロロタロニルに残留基準値はないが、保留基準は果実、野菜、芋類、テンサイ、茶について 1 μ g/ml である。従って、抽出段階で 10 倍希釈され、ELISA の安全率を 10 倍とすると、10ng/ml 以上の感度が必要となる。しかしながら、クローニング中に行った培養上清を用い

た間接競合 ELISA では、50%活性阻害濃度は 12E: 20ng/ml, 9A: 90ng/ml, 11D: 40ng/ml と、12E が最も良かったがいずれも満足できるものではなかった(図 2, 5)。

そこで、抗体を純化し、ペルオキシダーゼ標識

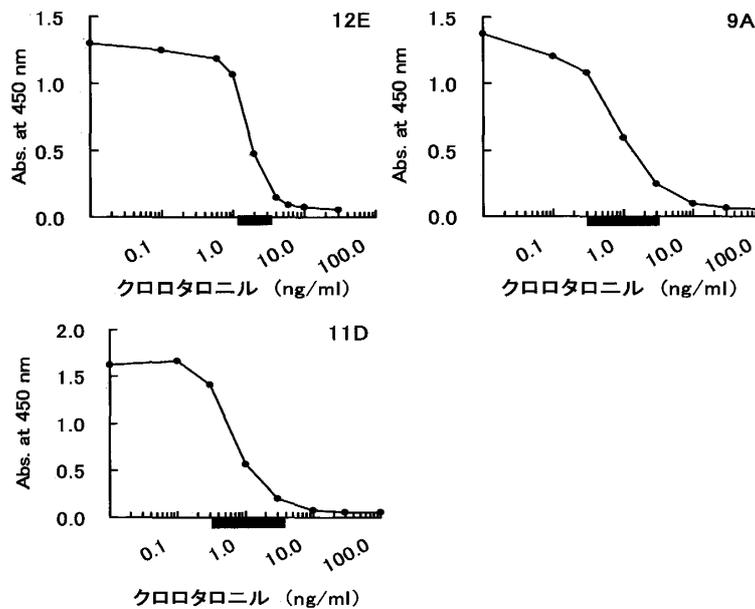


図 6 モノクローナル抗体の直接競合 ELISA における反応性
精製抗体を固相化後、一次反応としてペルオキシダーゼ標識クロロタロニルと遊離のクロロタロニルとを同時に反応させ、続いて 3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジンにより検出し、450nm における吸光度を測定した。横軸太線は定量範囲を示す。

表2 類似化合物との交差反応性

化合物名	交差反応性	
	9A	11D
クロロタロニル	100	100
フサライド	37.9	498
テトラジホン	<0.1	<0.1
テクロフサラム	<0.1	<0.1
PCP	1.7	<0.1

クロロタロニルに対する反応性を100とした場合の交差性を相対値で示した。

PCPを調製して、直接競合ELISAを導入した(図2)。直接競合法では抗体を固相化することによりその濃度を著しく高めることが出来るため、高感度化が期待できる。その結果(図6)、50%活性阻害濃度は12E: 1.8ng/ml, 9A: 0.7ng/ml, 11D: 0.8ng/mlとなり、先に示した間接競合ELISAよりも12Eでは10倍、9Aでは100倍、11Dでは50倍の高感度化が可能となった。また、定量可能範囲(横軸太線)を検討したところ、12Eでは1~3ng/ml, 9A, 11Dでは0.3~3ng/mlとなり、12Eは定量範囲が狭いため、実際の農作物中のクロロタロニルをスクリーニング的に定量する目的には合わないことが推測された。このように、同じ競合ELISAでも方法によって異なる結果が得られることは、今後のモノクローナル抗体樹立に際して貴重な知見である。出来るだけ多くのクローンを最後まで残して、多くの解析を行うことが必要であろう。

次に、9Aと11Dの二つに絞り、クロロタロニルの類似化合物であるテクロフサラム、フサライド、テトラジホンとの交差反応性を調べた(表2)。クロロタロニルに対する反応性を100%とし、その反応性に対する比率を交差反応性率として示した。どちらの抗体もテクロフサラム、テトラジホンに対してはほとんど反応しなかったが、フサライドに対して、11Dでは498%と5倍もの反応性を示し、9Aに関しても約30%の交差性が見られた。奇妙なことにマウスの免疫に用いた抗原であるPCPに対して11Dでは検出限界以下、9Aでは1.7%しか交差しなかった。これは、PCPのフェノール性水酸基の解離により生じる負の電荷が、抗体との結合を阻害するためではないかと推測された。さらに9Aに関しては、シアゾファミド、シモキサニル、ベノミル、プロシミド、オキサジキシル、イプロジオン、ペルメトリン、

オキシシン銅、アゾキシストロビン、メタラキシルなどの農薬に対する交差性は0.1%以下であった。

以上の結果、9Aは検出感度が高く、定量範囲も広く、類似化合物に対する交差性が低いことが明らかとなった。本定量系はクロロタロニル特異的評価系としてキット化され、平成17年秋には市販される予定である。

一般に本来の抗原よりもその誘導体に対して親和性が高い抗体をheteroclitic抗体という¹⁷⁾。これは、抗体産生がorder-madeではなく、クローン選択説に従ってready-madeで行われたことによるためとも考えられるし、タンパク質に結合させたことによって本来の抗原が誘導体の方に近い抗原性を示すようになったとも考えられる。今回の場合、PCPに対するheteroclitic抗体がとれたことになる。我々は既に新規ビタミンとして注目されているPQQに対するモノクローナル抗体の作製に成功しているが、この中にPQQよりそのオキサゾ誘導体に100倍近く親和性の高い抗体があった¹⁸⁾。この場合、この抗PQQ抗体のheteroclitic性を逆に利用して、PQQを前処理でオキサゾ化することによりその定量感度を100倍近く上げることに成功している¹⁹⁾。今回の場合も11Dをフサライド定量系に用いることも可能である。いずれにせよ、低分子化合物に対する抗体に関してはその交差反応性を十分に検討しておく必要がある。

輸入農作物の増大に伴い、農作物中に残留する農薬を迅速且つ簡便に分析する方法の開発が急務とされている。本研究で示されたモノクローナル抗体を用いたELISAによる分析法は、従来の分析法に代わる有用な方法であると思われる。また、抽出液を直接分析に供することのできるELISAは便利ではあるが、抽出液中の成分の妨害を受けやすいことが知られている。今後は、従来の分析法である高速液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーとの相関性や実際の野菜、果実への添加回収試験など市販農作物への適応の検討を行うことが必要である。同時に、他のより多くの農薬に対するELISA系が開発されることにより、一層汎用性の高い農薬定量系としてのELISAの需要が高まってくるものと期待される。

(平成17.9.3.受付)

引用文献

- 1) Y. Tonogai, Y. Tsumura, Y. Nakamura and T. Shibata: *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, 39, 13-25 (1998)

- 2) M. Nakazato, K. Tadano, H. Ogawa, H. Ushiyama, Y. Kawai, C. Kobayashi, Y. Tateishi and Y. Tamura: *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health.*, **37**, 127–134 (1996)
- 3) N. Takeda and M. Akiyama: *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **36**, 601–606 (1995)
- 4) Y. Chatani, T. Chikamoto, M. Munehisa, T. Adachi and M. Komatsu: *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **37**, 187–194 (1996)
- 5) Y. Ito, Y. Ikari, H. Oka, J. Hayakawa and T. Kagami: *J. Chromatogr. A.*, **810**, 81–87 (1998)
- 6) Y. Tonogai, Y. Tsumura, Y. Nakamura, H. Matsuki and Y. Ito: *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health.*, **38**, 270–281 (1992)
- 7) Y. Akiyama, M. Yano, T. Mitsuhashi, N. Takeda and M. Tsuji: *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **37**, 351–362 (1996)
- 8) Y. Yamazaki and T. Ninomiya: *J. AOAC Int.*, **79**, 787–790 (1996)
- 9) J. Grrido, M. Alba, I. Jimenz, E. Casado and L. Folgueiras: *J. Chromatogr. A.*, **765**, 91–97 (1997)
- 10) Y. Yuasa: *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **39**, 61–66 (1998)
- 11) J. R. Bushway, L. D. Brandon, H. A. Bates, L. Li, A. K. Larkin and S. B. Young: *J. Agric. Food Chsm.*, **43**, 1407–1412 (1995)
- 12) A. Szekacs and D. B. Hammock: *J. Agric. Food Chsm.*, **43**, 2083–2091 (1995)
- 13) S. Cairoli, A. Arnoldi and S. Pagani: *J. Agric. Food Chsm.*, **44**, 3849–3854 (1996)
- 14) A. Abad, J. M. Moreno, R. Pelegri, I. M. Martinez, A. Saez and M. Gamon: *J. Chromatogr. A.*, **833**, 3–12 (1999)
- 15) 森下恵美, 成田宏史: 本誌, **47**, 1–18 (1992)
- 16) 梅津憲治: 農薬と食ソフトサイエンス社 (2003)
- 17) S. Furusawa and Z. Ovary: *Int. Archs Allegy appl. Immun.*, **85**, 238–243 (1995)
- 18) H. Narita and E. Morishita: *J. Biochem.*, **117**, 830–835 (1995)
- 19) H. Narita and E. Morishita: *Enzymology.*, **280**, 158–167 (1997)