

炭酸バッファー (pH 8.3) : コースター

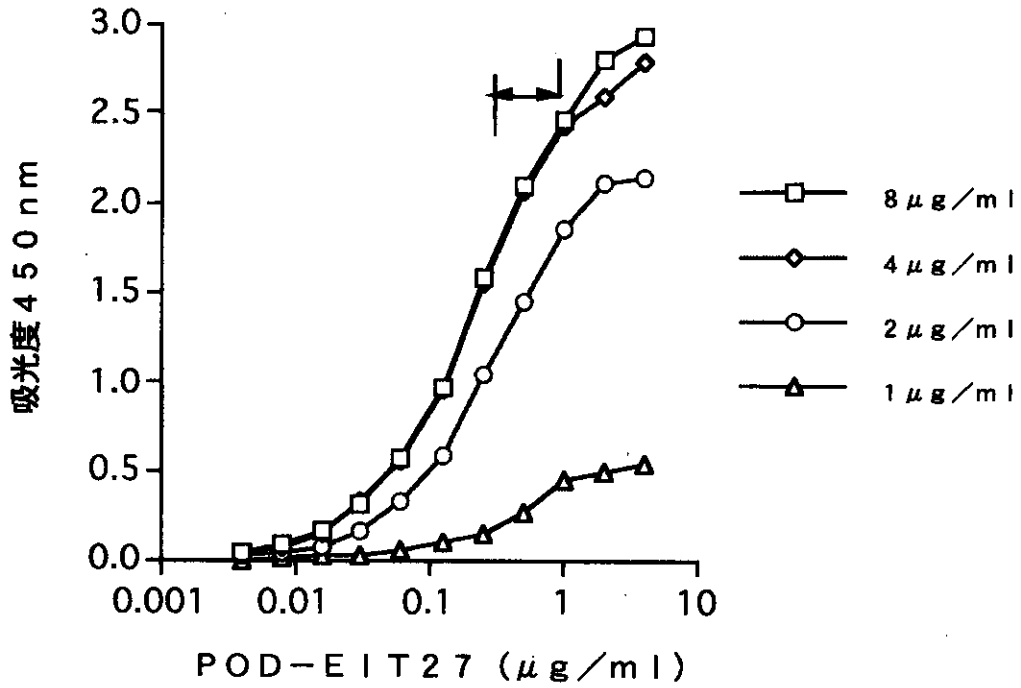


図1 抗体固相化量とPOD-ハプテン量

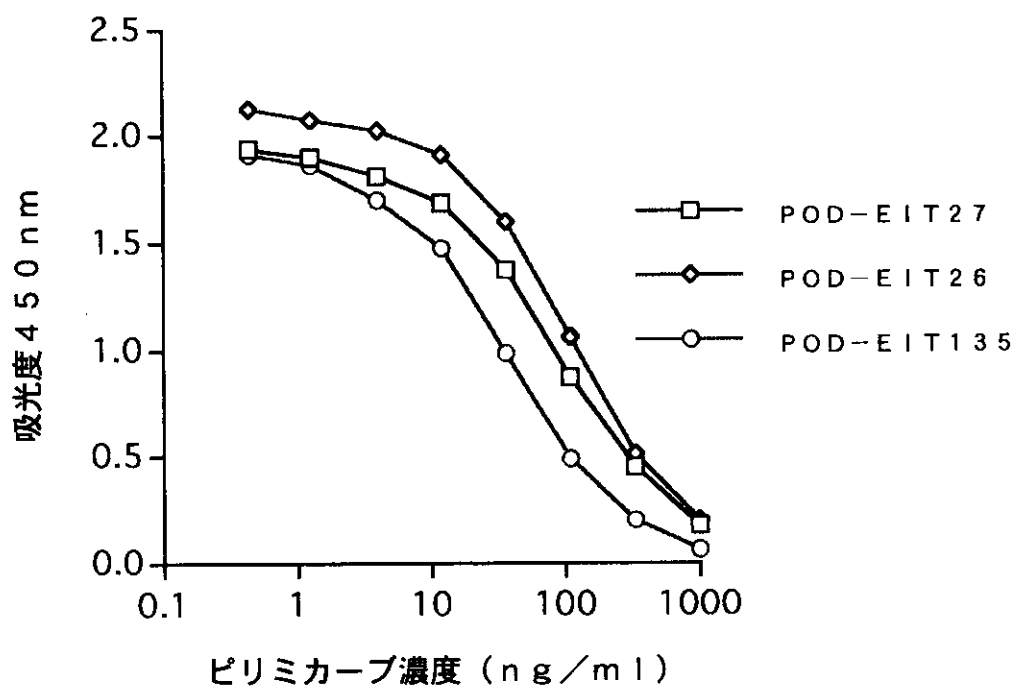
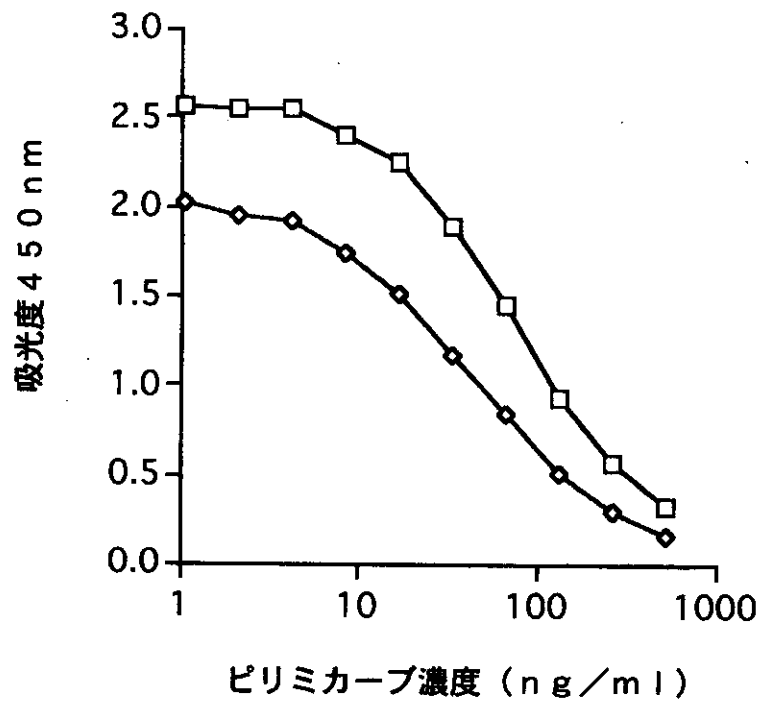


図2 ラベリングハプテンの種類による感度の比較



—□— 0.6 μg/ml / POD-EIT135 ; 4 μg/ml / PMC27-29
 —◇— 0.3 μg/ml / POD-EIT135 ; 4 μg/ml / PMC27-29

図3 ラベリングハプテンPOD-EIT135量の決定

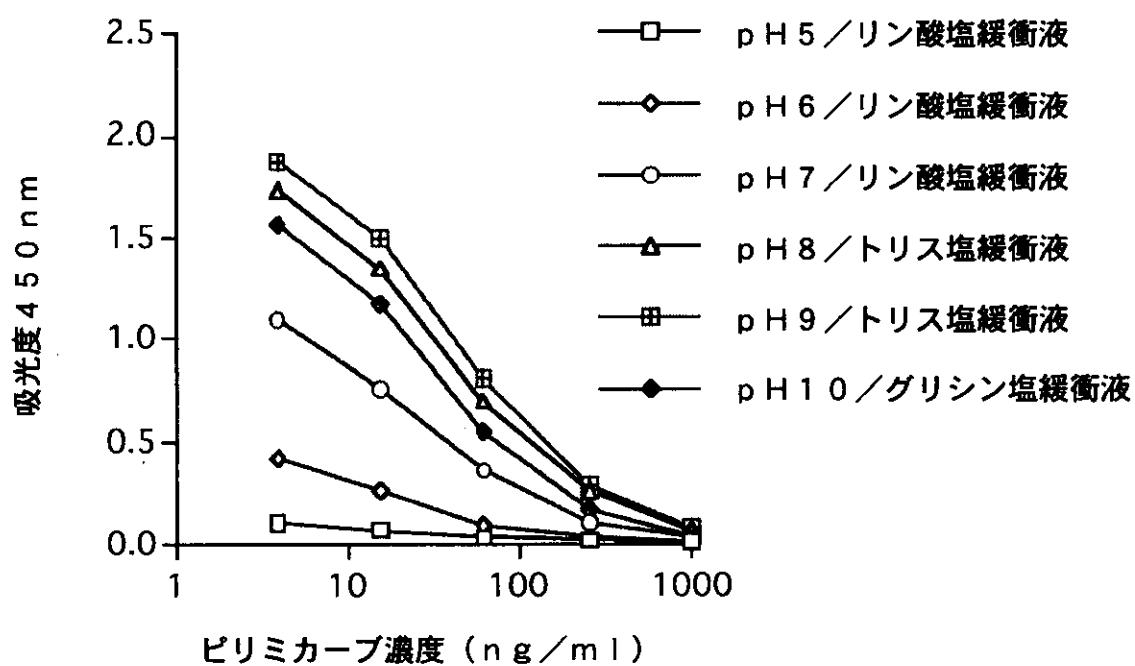


図4 ピリミカーブ測定のパH依存性

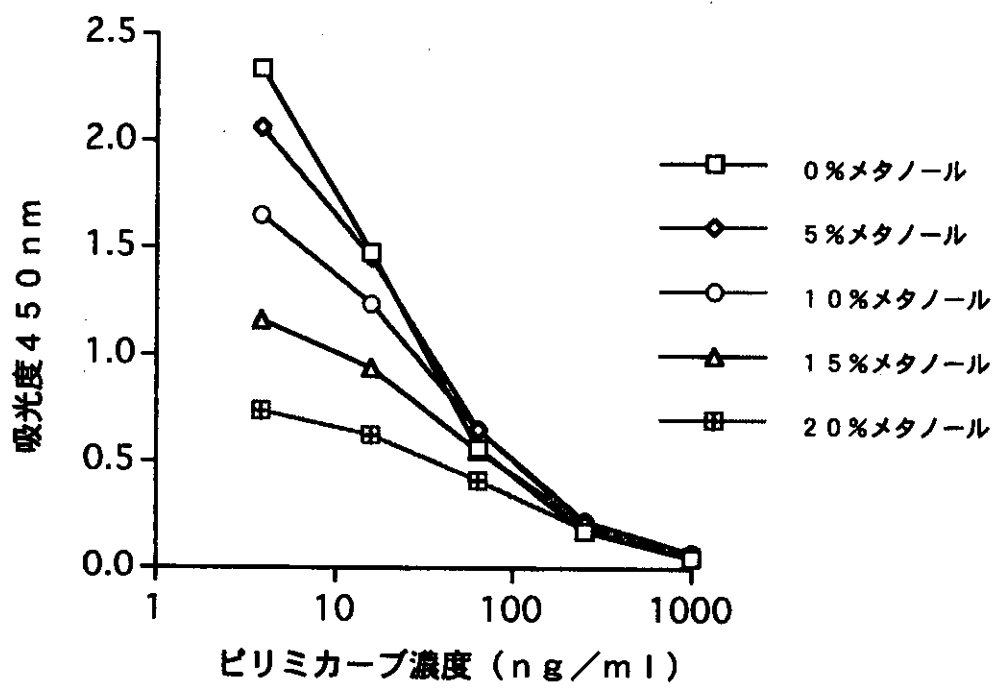


図5 直接競合阻害ELISA法のメタノール濃度依存性

分担研究報告書

農薬イムノアッセイと機器分析の比較評価に関する研究

(3) 残留農薬のイムノアッセイキットによる分析

分担研究者 中澤 裕之

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

農薬イムノアッセイと機器分析の比較評価に関する研究
(3) 残留農薬のイムノアッセイキットによる分析

分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学教授

研究要旨

競合ELISA法のダイアジノンとアルジカルブの市販キットの有用性について検討した。ダイアジノンキットでは、その検出能力も高く、他の農薬や野菜の影響は少く、スクリーニング法としては有効な手段となることが示唆された。しかし、アルジカルブキットでは、検量線の段階で変動が大きく、実用に供することはできなかった。

研究協力者

武田明治 日本大学生物資源科学部
食品科学工学科
千野 誠 日本大学生物資源科学部
食品科学工学科
松藤 寛 日本大学生物資源科学部
食品科学工学科
永山敏廣 東京都立衛生研究所
上野英二 愛知県衛生研究所
野村孝一 (財)日本食品分析センター

た酵素を用いる酵素免疫測定法 (EIA)、ラジ
オイムノアッセイ、ラテックス凝集法および
イムノクロマトグラフィーなどがあるが、多
く利用されているのはEIAである。EIAのなか
でも、抗体（または抗原）をコーティングし
た固相を用いる酵素標識抗体測定法 (ELISA)
が一般的である²⁾。

現在、市販されているイムノアッセイキッ
トでは、抗体をコーティングした固相が試験
管またはマイクロウェル、磁気ビーズ、ラテ
ックスなどと異なる。しかし、いずれのタイ
プにおいても操作が簡便であり、また、その
測定時間も試料調製時間を除けば、試験管タ
イプで15~30分、マイクロウェルタイプで約
2時間、磁気ビーズタイプで40~60分、ラテ
ックスタイプで20分以内と短時間で測定結果
が判明する。

これらの方法の概要は、まず、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。次に、一定量の酵素標識抗原と抗原（対
象物質）を添加することで、抗原と標識抗原
との間で、抗体との結合に競合を生じさせる
（競合法）。インキュベーション後、遊離の標
識抗原を洗浄により除去したのち、抗体に結

A. 研究目的

イムノアッセイは測定対象物質または測定
対象化学物質を抗原とする抗体を用い、抗原
抗体反応の高い特異性を利用して化学物質濃
度を測定する方法である。化学物質は通常低
分子化合物であり、そのままでは動物に免疫
しても抗体はできないので、通常タンパク質
に測定対象化学物質を結合させ、動物に免疫
して抗体を作製する。一般にマウスを用いた
モノクローナル抗体とウサギを用いたポリク
ローナル抗体がよく使われている¹⁾。

イムノアッセイには、抗原抗体反応の検出
方法の違いにより、抗原または抗体に結合し

合した酵素と基質（基質液＋発色剤）を反応、発色させ、その450nmにおける吸光度を測定する。吸光度は、対象物質の濃度が高くなるほど抗体に結合する標識抗原が少なくなるため、発色が弱くなる（図1）。

イムノアッセイは臨床診断の分野でルーチン的に使用されてきた分析方法であるが³⁾、今日では、環境分析や残留農薬の分析のスクリーニング法として注目され、米国環境保護庁のような行政機関においてもイムノアッセイに使用する試薬の認証基準や性能ガイドを定めてきている⁴⁾。

ELISA法を用いて残留農薬を分析した例も報告されてきているが^{5) 6)}、スクリーニング分析法とする際の問題点が十分に検討されているとはいえない。

そこで、今回は、有機リン系殺虫剤のダイアジノンとカーバメート系殺虫剤で日本では使用が許可になっていないアルジカルブについて、交差反応性を中心に検討したので報告する。

B. 研究方法

1. イムノアッセイキット

イムノアッセイキットはエンバイロガード（SDI社製造、USA、輸入・販売元チッソ株式会社新事業開発室）のウェルタイプよりダイアジノン用とアルジカルブ用のものを購入した。このキットはマグネットラックなどの特別の機器を必要とせず、低濃度でも検出可能である。

キットの内容

- i) マイクロタイタープレート（12ウェル×8ストリップ）
- ii) 酵素複合体液（Enzyme Conjugate）
- iii) 陰性コントロール液（Negative Control）【アルジカルブのみ】
- iv) 基質液（Substrate）

v) 発色液（Chromogen）【アルジカルブのみ】

vi) 標準液【ダイアジノンのみ】

vii) 反応停止液（Stop Solution）

なお、キットは4～8℃で保存した。

2. 試薬

メタノール 和光純薬工業（株）特級試薬
リン酸緩衝生理食塩水（PBS） 和光純薬工業（株）組織洗浄用

組成 NaH₂PO₄・2H₂O…… 9.0g
NaH₂PO₄・12H₂O…… 64.5g
NaCl………160.0g

以上をイオン交換水に溶かして20Lとする。

アルジカルブ 和光純薬工業（株）残留農薬試験用

3. 装置

マイクロプレートリーダーは、セティ社製のハンディーフォトメーターModel-6を用い吸光度の測定を行った。

また、必要により回転式振盪器を使用した。

4. キット操作法

キットの操作方法を以下のように行った。

- ①使用したい分のストリップだけをストリップホルダーからはずし、室温に暖めておく。また、試薬類も室温とする。
- ②ダイアジノンはキット内の標準液より、アルジカルブは残留農薬試験用の標準品より調製する。
- ③ストリップのウェルに陰性コントロール、標準液および試料溶液を滴下する。
- ④酵素複合体を各ウェルに加え混合する。
- ⑤蒸発を防ぐためウェルをパラフィルムまたはセロテープでカバーし、中身が隣のウェルと混じらない程度に良く混合する。
- ⑥室温（18～23℃）で1時間静置する。（回転式振盪器で静かに振盪しても良い）
- ⑦パラフィルムやセロテープをはがし、ストリップをしっかりとってウェルの中身を捨て

る。それぞれのウェルを蒸留水で完全に満たし、振ってから中身を捨てる。これを5回以上繰り返す。ウェルを良く振って中の水を良く切り、最後にペーパータオルの上で叩いてできる限り水を取り除く。

⑧基質液を各ウェルに滴下する。

⑨アルジカルブの場合は、さらに発色液を滴下する。

⑩⑤と同様にカバーをし、⑥のように室温で3

0分間静置する。

⑪30分経過後、各ウェルに反応停止液を加え、良くかき混ぜる。

⑫30分以内にマイクロプレートリーダーで吸光度を測定する。

結果は下式より% B₀を算出し、縦軸に% B₀、横軸に対数目盛で農薬濃度を表した検量線を作り、試料溶液の農薬濃度を算出する。

$$\% B_0 = \frac{\text{標準液および試料溶液の吸光度}}{\text{陰性コントロールの吸光度}} \times 100$$

5. 交差反応性

抗原抗体反応は特異的ではあるが、認識部位によっては化学構造が類似しているものに対して反応する可能性がある。また、化学構造的には類似していなくてもその反応を阻害する化学物質の存在も否定できない。そこで、ダイアジノンについては、有機リン系農薬（主に殺虫剤）に関する交差反応性を検討した。

その方法は、各農薬の0.5または1.0 μg/ml 溶液を作り、その% B₀を求めた。また、交差性が疑われる農薬に関しては、適当な濃度の溶液を作り、50% B₀を求めた。

6. 添加回収試験

トマト、なす、キャベツ、ねぎ、ほうれんそう、いちご、みかん、きゅうりの各10gにダイアジノン1 μgを添加して、その回収率を求めた。

C. 研究結果及び考察

1. キットの精度について

i) ダイアジノン

イムノアッセイにおいては、インキュベーション温度や測定時間などの影響で測定ごとに検量線を作成する必要があるといわれる。そのため、キット添付標準品の濃度の精度が

重要となる。そこで、キット標準品と市販の残留農薬試験用標準品の比較を行った(表1)。

キットの取扱説明書により作成する検量線濃度は、30、100、500 pg/mlであるが、低濃度の30、100 pg/mlにおいても市販の標準品との差は見られなかった。

そこで、検量線はキット標準品を用いて作成した(図2)。測定ごとの検量線は、表記定量範囲でR²=0.95以上の良好な直線性を示したが、測定毎や同じロットにおいてもキットごとの変動は大きく、キットBにおける100 ppbの変動率は17.2% (n=8)を示した。このことより、ストリップごとおよび測定ごとに検量線の作成が必要と思われた。

なお、マグネットラックを使用したイムノアッセイにおいても変動が大きいと報告されている⁷⁾。

ii) アルジカルブ

アルジカルブの検量線の標準液は、農薬標準品で1 mg/mlのメタノール溶液より、水で希釈して1、5、20 ng/ml 溶液を調製した。

アルジカルブの検量線は、陰性コントロール液であっても% B₀が非常に低く(吸光度0.09~0.17)、このため検量線も変動が大きく、実用には供することはできなかった(図3)。

この原因に関しては、今後検討していく予定である。

2. ダイアジノンキットの交差反応性

イムノアッセイの反応は特異的ではあるが、化学構造が類似しているもの同士を識別できるかどうかは重要な問題である。また、同じ用途に使われる農薬の中に反応を阻害するような化学物質の存在も否定できない。

そこで、ダイジノンの化学構造式に一部類似した物質について、ダイアジノンキットに対する交差反応性を求めた(表2)。調べた物質は、ダイアジノンの代謝産物であるダイアゾキソン、有機リン系殺虫剤のピリミホスメチル、クロルピリホス、プロチオホス、エトリムホス、カーバメート系のピリミカブ、日本では登録されていないパラチオン、ピリミホスエチルなどである(図4)。なお、測定濃度は、500ng/ml(10%メタノール/PBS溶液)とした。

測定した農薬の中で、ダイアゾキソン、ピリミホスメチル、ピリミホスエチル、エトリムホスに交差反応性が疑われたので、各農薬について3点以上の濃度系列を作り、ダイアジノンの検量線に対する濃度の関係を求めた。交差反応性の表し方については規定がないが、陰性コントロールに対する50%B₀の濃度で示すことが多い。そこで、結果は、各農薬の50%B₀に相当する濃度とダイアジノンの50%B₀を100%としたときの交差反応率で示した(表3)。ダイアゾキソンおよびピリミホスエチルは、ダイアジノンに対して1/2、ピリミホスメチル、エトリムホスは、約1/2,000の交差反応率であった。

次に、ダイアジノン同様に使用される有機リン系農薬の交差反応性を求めた。各農薬の濃度は1μg/ml溶液を調製し、その%B₀を求めた(表4)。ダイアジノンと構造が類似していない農薬には交差反応性がほとんど見られ

なかったが、除草剤のアミプロホスメチルに弱い反応性(50%B₀=16,500ng/ml)、また有機リン系殺虫剤ではあるが、ダイアジノンとは構造がやや違うピリダフェンチオン(図5)に反応性(50%B₀=3,800ng/ml)が見られた。

以上の結果から、このキットで陽性となった場合、複数の類似化合物の存在が考えられるが、登録された農薬に対する反応性は弱く実用上はほとんど問題にはならないものと思われる。

3. ダイアジノンの添加回収試験

イムノアッセイにおいては、他の農薬の交差反応性だけでなく、使用する際の農作物由来成分による妨害についても検討する必要がある。そこで、数種の野菜におけるキットに対する影響と回収率を求めた。その試験方法を図6に、また、結果を表5に示した。

測定したどの野菜においても、作物由来成分の妨害は見られなかった。また、回収率は86%以上の良好な結果を示した。

D. 結論

競合ELISA法のダイアジノンとアルジカルブのキットの有用性について検討した。ダイアジノンキットでは、その検出能力も高く、他の農薬や野菜の影響は少く、スクリーニング法としては有効な手段となることが示唆された。しかし、アルジカルブキットでは、検量線の段階で変動が大きく、実用に供することはできなかった。今後、これらキットを使用する際の問題点をさらに検討し、有効なスクリーニング法としての完成をめざす予定である。

参考文献

- 1)湯浅洋二郎:食品衛生雑誌, 39(2), 61-66 (1998).
- 2)牛山正志:ぶんせき, 1998(10), 736-747

(1998).

3) Yalow, R.S.; Beeson, S.A.: *Nature*, 184, 1, 648

(1959).

4) Krotzky, A.J.; Bernd, Z.: *Pure and Appl.*

Chem., 67, 2065-2088(1995).

5) 小林裕子: *ぶんせき*, 1997(1), 42-50

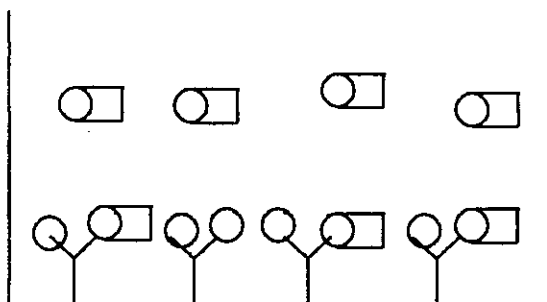
(1997).

6) Meulenbergh, E.P.; Mulder, W.H.; Stoks, P.G.:

Environ. Sci. Technol., 29, 553(1995).

7) 林明子他: 第20回日本農業学会, 全農残留
農薬分析研究会講演要旨(1997).

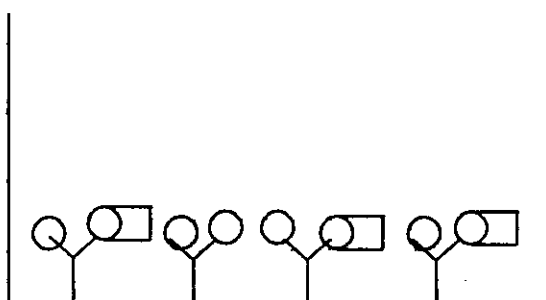
試料液や標準液に酵素標識抗原液を加えてインキュベートする



○ 抗原
(対象物質)

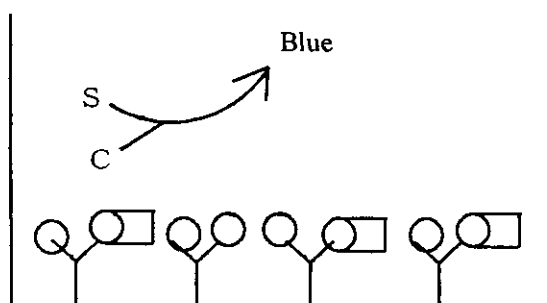
Y 抗体

ウェル内の液を捨てた後、水を満たし、洗浄を繰り返す



○ 酵素標識抗原

基質および発色剤を加えインキュベートして発色させる
対象物質濃度が高いほど発色が弱い



S = 基質

C = 発色剤

図 1 競合 ELISA 法

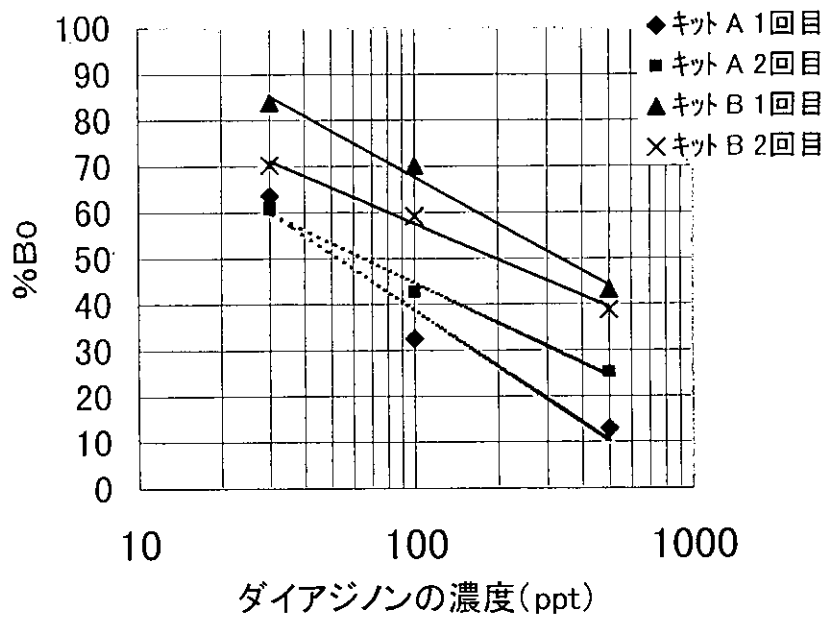


図 2 ダイアジノンの検量線

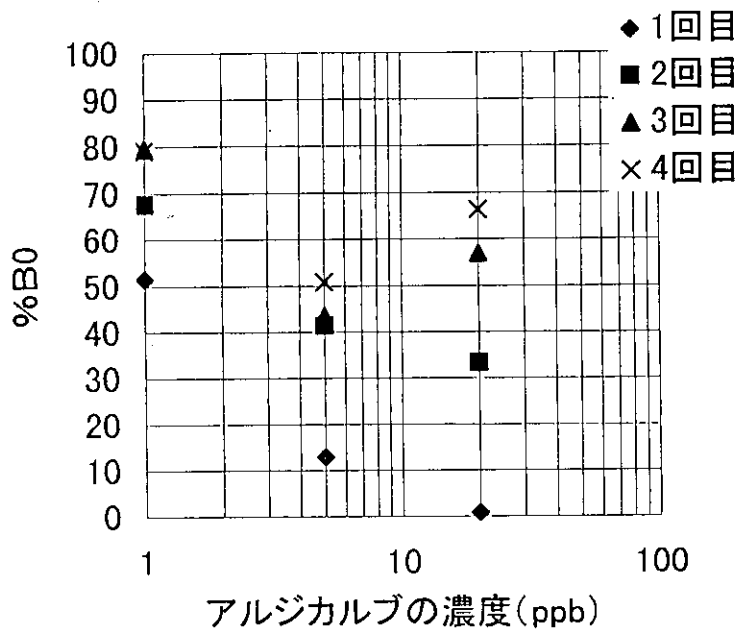
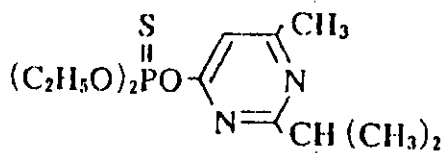
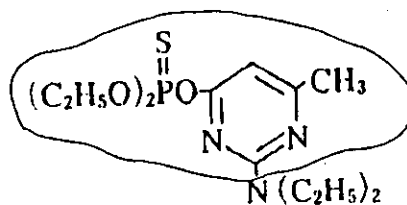


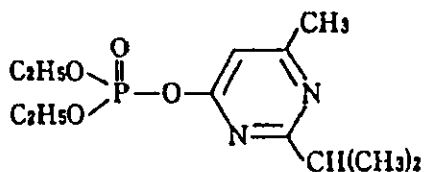
図 3 アルジカルブの検量線



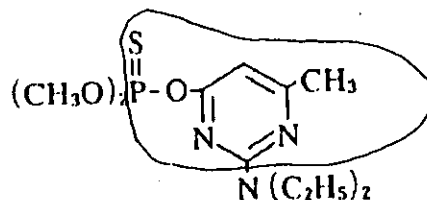
Diazinon



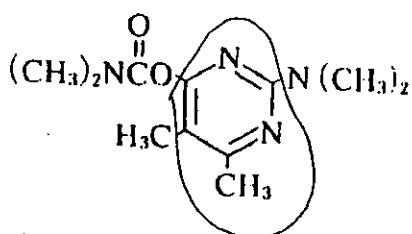
Pirimiphos-ethyl



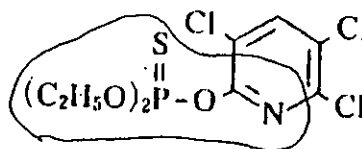
Diazoxon



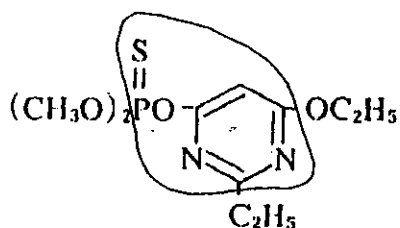
Pirimiphos-methyl



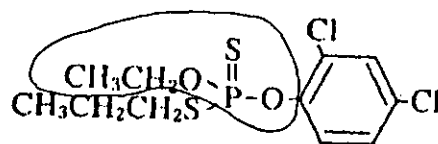
Pirimicarb



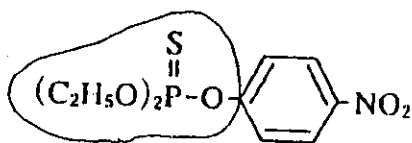
Chlorpyrifos



Etrimfos

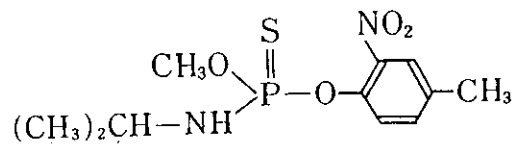


Prothiophos

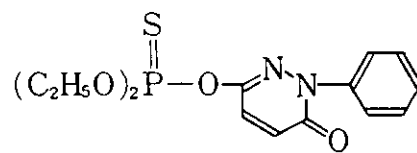


Parathion

図 4 ダイアジノンと交差反応性の疑われる農薬



Amiprofos-methyl



Pyridaphenthion

図5 アミプロホスメチルとピリダフェンチオンの化学構造式

細切試料 10g

ダイアジノン標準品 1 μ g 添加
(100 μ g/ml アセトン溶液を 10 μ l 添加)
2 時間放置
メタノール:PBS (1:9) 100 ml

振とう 10 分・ろ過

2ml 分取 (250ml 容有栓メスシリンダー)

メタノール:PBS (1:9) 200ml 定容

振とう・ろ過

試験液 (5ml 褐色試験管)

図 6 添加回収試験の処理方法

表1 ダイアジノンキット標準品と農薬標準品の%B₀による比較

キット標準品 (水にて希釈)					
	1	2	3	平均値	%B ₀
0 ppt	1.129	1.156	1.138	1.141	100.0%
30 ppt	0.565	0.606	0.563	0.578	50.7%
100 ppt	0.365	0.348	0.304	0.339	29.7%

農薬標準品 (1000 μg/ml メタノール溶液を水にて希釈)					
	1	2	3	平均値	%B ₀
0 ppt	1.200	1.036	1.090	1.109	100.0%
30 ppt	0.560	0.547	0.561	0.556	50.2%
100 ppt	0.348	0.378	0.304	0.343	31.0%

表2 ダイアジノンキットに対する交差反応性

	%B ₀
Diazoxon	13.0 %
Pirimiphos-ethyl	13.6 %
Pirimiphos-methyl	83.9 %
Pirimicarb	112.5 %
Etrimfos	86.1 %
Parathion	108.2 %
Chlorpyrifos	100.5 %
Prothiofos	116.5 %

各農薬濃度 : 500 ng/ml

表3 ダイアジノンキットに対する50%B₀とダイアジノンに対する
交差反応率

	50% B ₀ に相当する濃度 (pg/ml)			交差反応率(%)
	1	2	平均値	
Diazinon	59	32	45.5	100
Diazoxon	67	110	88.5	195
Pirimiphos-ethyl	25.5	170	97.8	215
Pirimiphos-methyl	1390	-	1390	3055
Etrimfos	1230	-	1230	2703

表5 野菜に対する添加回収試験の結果

	Diazinon STD 0.1ppm添加				濃度(ppt)	回収率	無添加			
	1	2	平均値	%B ₀			1	2	平均値	%B ₀
トマト	0.301	0.337	0.319	37.5%	83	91%	0.753	0.753	0.753	88.5%
なす	0.300	0.341	0.321	37.7%	82	90%	0.772	0.785	0.779	91.5%
キャベツ	0.322	0.336	0.329	38.7%	78	86%	0.786	0.786	0.786	92.4%
ねぎ	0.317	0.298	0.308	36.1%	82	90%	0.815	0.787	0.801	94.1%
ほうれんそう	0.312	0.281	0.297	34.8%	93	102%	0.822	0.786	0.804	94.5%
いちご	0.303	0.295	0.299	35.1%	90	99%	0.772	0.796	0.784	92.1%
みかん	0.291	0.290	0.291	34.1%	94	103%	0.765	0.792	0.779	91.5%
きゅうり	0.297	0.278	0.288	33.8%	97	107%	0.730	0.786	0.758	89.1%

表 4 ダイアジノンに対する有機リン系農薬の交差反応性

Accephate	×	Methidathion	×
Amiprofos-methyl	△	Phenthoate (PAP)	×
Butamifos	△ △	Phosalone	×
Chlorpyrifos	×	Phosmet (PMP)	×
Chlorpyrifos-methyl	×	Piperophos	×
DDVP	×	Profenfos	×
Dichlofenthion	×	Propaphos	×
Dimethoate	×	Prothiofos	×
Disulfoton	×	Pyraclufos	△ △
Edifenfos (EDDP)	×	Pyrazophos	×
Ethion	×	Pyridaphenthion	△
Fenitrothion (MEP)	×	Pyrimiphos-methyl	△
Fenthion	×	Quinalphos	×
Formothion	×	Salithion	×
IBP	×	Sulprofos	×
Isofenfos	△ △	Thiometon	×
Isoxathion	×	Tolclofos-methyl	×
Malathion	×	Trichlorfon (DEP)	×

結果の×は%B。が85%以上、△△は84-80%、△は79-50%を示す