

図 2 混合標準溶液のLC/MSクロマトグラム
TIC : トータルイオンクロマトグラム

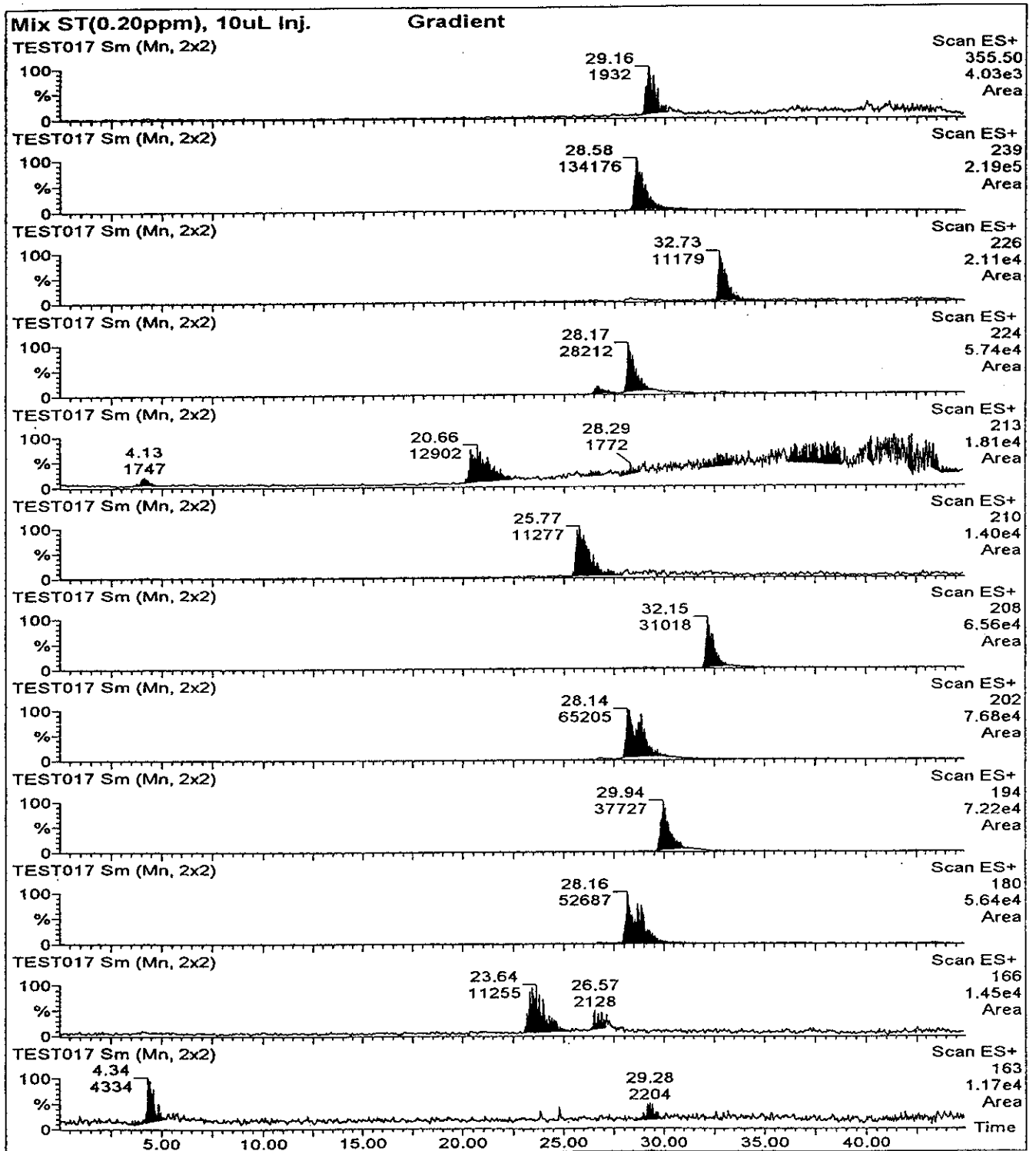


図 3 LC/MSクロマトグラムによる面積測定

分担研究報告書

農薬免疫アッセイと機器分析の比較評価に関する研究

(1) 免疫化学的測定法による植物成長調整剤

イナベンフィドの分析

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

農業イムノアッセイと機器分析の比較評価に関する研究

(1) 免疫化学的測定法による植物成長調整剤イナベンフィドの分析

分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学 教授

研究要旨

イソニコチン酸アニリド系植物成長調整剤であるイナベンフィドに関して、免疫化学的測定 (ELISA)法の開発を行った。本研究においては、玄米に由来した夾雑成分の影響を受けることの無い ELISA を用いた玄米中イナベンフィド分析法を構築し、その有用性を検討するために従来からの分析法である HPLC 及びイナベンフィドの公定分析法である GC/ECD との相関性試験を試みた。その結果、双方には、非常に高い相関関係が認められ、本法が日常分析法として高い有用性を有することが示唆された。

研究協力者

湯浅洋二郎 (株)環境免疫技術研究所
研究開発本部長

A. 研究目的

イナベンフィド [4-chloro-2'-(α -hydroxybenzyl)isonicotinilide]は、イソニコチン酸アニリド系植物成長調整剤として、植物成長ホルモンであるジベレリンの生合成を阻害することにより、特に、イネ科植物に優れた歪化作用を発現する[1-2]。平成5年3月に玄米に対し、0.05 ppm と残留基準値が設定された[3-5]。イナベンフィドの厚生省告示法での試験方法は、クロロアセチル誘導体化後、GC/ECD 分析と規定されている[3-4]。しかし、この方法は、非常に煩雑な操作を必要とすること、更には、人体に有害な有機溶媒を必要とすること等、分析方法に幾つかの問題点がある。このような背景から、迅速且つ簡便なイナベンフィドの残留分析法の開発が望まれており、免疫化学的測定法開発研究の対象として取り上げた。

B. 研究方法

B-1. 試料

埼玉県産玄米を用いた。玄米の破碎は、(株)環境免疫技術研究所にて実施した。

B-2. 試薬及び試液

イナベンフィド標準品は、関東化学社製環境分析

用標準品(純度:97.0%以上)を用いた。

イナベンフィド標準原液は、イナベンフィド 100 mg を精秤し、メタノール 100 mL に溶解した(1 mg/mL)ものを ELISA 用、アセトニトリル 100 mL に溶解した(1000 ppm)ものを機器分析用としてそれぞれ、用いた。

各種有機溶媒、カラムクロマトグラフィー用シリカゲル、フロリジル及びその他の試薬類は、全て、和光純薬工業社製特級試薬を用いた。

o-フェニレンジアミン、Tween 20 は、シグマ社製、液状ブロックエースは、大日本製薬社製を用いた。

ポリスチレン製 96 ウェルマイクロタイタープレートは、住友ベークライト社製を用いた。

B-3. 装置

96 ウェルマイクロタイタープレートの吸光度測定には、バイオラッド社製マイクロプレートリーダー Model 550 を用いた。

GC/ECD の測定には、Hewlett-Packard 社製ガスクロマトグラフ HP 6890 を用いた。分析カラムには、HP-5 (30m×0.25 mm、膜厚 0.25 μ m)を、カラム温度は 220°C、検出器温度は 280°C、注入口温度は 250°C に設定し、2 μ L を注入して分析した。

HPLC の測定には、島津製作所社製高速液体クロマトグラフ LC-10AD を用いた。分析カラムには、YMC 社製 J'sphere ODS-H80 (4.6×150 mm、粒径 4 μ m)を、移動相にはアセトニトリル:水 (35:65)を流速 1.0 mL/min で送液した。検出波長を 270 nm に設定し

た。

B-4. 直接競合 ELISA

イナベンフィド測定には、免疫化学的測定法の一つである直接競合 ELISA を用いた。マウス腹水から硫酸塩析により精製した抗イナベンフィドモノクローナル抗体(MoAb)を 96 ウェルマイクロタイタープレートに固相化し、イナベンフィドと西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合イナベンフィドハプテンとを競合的に 1.5 時間反応させた。反応後、未反応物を洗浄し、HRP に対する基質溶液を加えて発色反応を行い、0.5 M 硫酸にて反応を停止させた後、490 nm の吸光度を測定した。

B-5. ELISA 用試験溶液の調製法

測定対象作物は、残留基準値が設定されている玄米を用いた。破碎玄米(420 μm) 10 g にメタノール 25 mL を加え、充分膨潤させた。30 分間振とうし、吸引ろ過により抽出液を回収後、メタノールで 25 mL に定容した。更に、0.1% (v/v) Tween 20 を添加した 10 mM リン酸塩緩衝液(PBS、pH7.2)により希釈した溶液を ELISA 用試験溶液とした(Fig. 1)。

B-6. 機器分析用試験溶液の調製法

HPLC 用試験溶液の調製法: 破碎玄米(420 μm) 20 g に精製水 40 mL を加え、2 時間、膨潤した。これにアセトン 100 mL を加え、30 分間激しく振り混ぜた後、吸引ろ過した。吸引漏斗の残留物をアセトン及び水の混液(3:7) 100 mL を加え、洗浄した。得られたろ液をロータリーエバポレーターで約 70 mL に減圧濃縮した。これを 500 mL の分液漏斗に移し、2 N 塩酸 150 mL 及び n-ヘキサン 100 mL を加えて、5 分間激しく振り混ぜた。水相を 10 N 水酸化ナトリウムで中和し、酢酸エチル及び n-ヘキサンの混液(2:8) 100 mL を加えて、5 分間激しく振り混ぜた後、有機相を分取した。この有機相を無水硫酸ナトリウムで脱水し、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。残留物をアセトン及び n-ヘキサンの混液(15:85) 5 mL に溶解した。内径 15 mm、長さ 300 mm のカラム管にフロリジル 10 g、次いでその上に無水硫酸ナトリウム約 5 g をアセトン及び n-ヘキサンの混液(15:85)に懸濁したものを入れ、カラムの上端に少量のアセトン及び n-ヘキサンの混液(15:85)が残る程度までアセトン及び n-ヘキサンの混液(15:85)を流出させた。このカラムに残留物を溶解した溶液を負荷した後、アセトン及び n-ヘキサンの混液(15:85) 50

mL を注入し、カラムを洗浄した。次いで、アセトン及び n-ヘキサンの混液(20:80) 100 mL を注入し、イナベンフィドを溶出させた。得られた溶出液を減圧乾固し、その残留物にアセトンを加えて溶かし、正確に 5 mL としたものを HPLC 用試験溶液とした。

GC/ECD 用試験溶液の調製法: 厚生省告示イナベンフィド試験法に準じた[3]。

C. 研究結果

C-1. 抽出溶媒による直接競合 ELISA への影響

イナベンフィドの各種溶媒に対する溶解度は、水に対して 1 mg/L、メタノール、アセトンに対して 2.35 g/L 以上と実試料から効率的にイナベンフィドを抽出する為には、メタノール等の有機溶媒を用いた抽出操作が必要となる。本節では、機器分析での抽出溶媒として、繁用されるアセトン、アセトニトリル及びメタノールを用い、これら有機溶媒の直接競合 ELISA への影響に関して検証した。

固相化濃度を 10 $\mu\text{g/mL}$ 、緩衝液として PBS を用い、HRP 結合イナベンフィドハプテン濃度を 100 ng/mL、各種有機溶媒の添加濃度を 5% (v/v) となるように調製し、1.5 時間、競合反応を行った際に得られた阻害曲線を Fig. 2 に示した。Fig. 2 より、3 種の有機溶媒の中ではメタノールが最も反応性が良く、測定感度も良好であることが分かった。従って、玄米からの抽出溶媒として、メタノールを選択することとした。

しかし、免疫化学測定法は、抗体を用いた分析法であるために、過剰の有機溶媒の使用は、抗体の有する反応性や測定感度に影響を及ぼすものと考えられる。そこで更に、抗イナベンフィド MoAb の有する ELISA 感度及び反応性に対するメタノールの影響を検証し、最適添加濃度を決定した。

メタノール最終添加濃度を 1~30% (v/v) とし、1.5 時間、競合反応を行った際に得られた阻害曲線を Fig. 3 に示した。Fig. 3 より、メタノール濃度が 1~10% (v/v) では、十分な吸光度が得られた。即ち、十分な反応性を得ることが出来た。また、測定感度は、メタノール最終添加濃度が 20% (v/v) 以上とした場合、 IC_{50} 値は 6 ng/mL 以上を示し、1~10% (v/v) の場合と比較すると著しい感度低下が認められた。

これらの結果より抗イナベンフィド MoAb は、メタノール最終添加濃度を 10% (v/v) 以下とすることで、本抗体の有する反応性や測定感度に影響を及ぼすこ

となく、イナベンフィドを分析することが可能であることが明らかとなった。

C-2. 玄米抽出液の直接競合 ELISA への影響

Fig. 1 に示したように ELISA 用試験溶液の調製法は、玄米からの抽出及び PBS による希釈のみでクリンナップ操作は、行わなかった。従って、その分、玄米由来の夾雑成分が試験溶液中には、多く含まれており、ELISA に影響を及ぼすことが考えられた。本節では、得られた玄米抽出液に既知濃度のイナベンフィドを添加し、メタノール標準溶液から得られた阻害曲線との比較により、夾雑成分の ELISA への影響に関して検討した。

得られた玄米抽出液を PBS で 10 倍に希釈した溶液を分析に用いた場合、吸光度を用いたメタノール標準溶液及び玄米抽出液の阻害曲線は、一致せず、玄米抽出液の標準曲線がメタノール標準溶液の阻害曲線よりも高い吸光度を示した(Fig. 4)。この結果より、玄米抽出液とメタノール標準溶液との反応性に差が認められ、玄米に由来した夾雑成分の影響が考えられた。このような夾雑成分の ELISA への影響は、抽出液を更に PBS で希釈することにより、反応性の改善を行うことも可能であると考えられた。しかし、イナベンフィドの玄米に対する残留基準値は、0.05 ppm であり、抽出液の希釈倍率を 10 倍以上に設定した場合、基準値近傍の測定が行えなくなると考えられた。そこで、試験溶液中に添加剤を用い、反応性の改善に関して検討を試みた。添加剤として、界面活性剤 Tween 20 を用いた。前述の方法に従い調製した玄米抽出液を用いて 0.01~1.0% (v/v) の Tween 20 を添加し、直接競合 ELISA を行った。その結果、0.1% (v/v) 以下の濃度で添加した場合にメタノール標準溶液及び玄米抽出液の吸光度による阻害曲線が一致し、反応性に改善が認められた(Fig. 4)。また、この Tween 20 添加濃度においては、イナベンフィドの測定に影響を及ぼすことは、無かった。一方、添加濃度を 0.5% (v/v) 以上とした場合、再び双方の阻害曲線の解離が認められ、更には、測定感度の低下も生じた(data not shown)。これらの知見から、Tween 20 を 0.1% (v/v) 以下の濃度で添加することにより、玄米に由来した夾雑成分の影響を回避し、イナベンフィドの残留基準値近傍の濃度を測定できるものと考えられた。

C-3. 添加回収試験

確立した ELISA 条件に基づき、イナベンフィドが 5~500 ppb の濃度レベルになるように添加した模擬検体を用いて、添加回収試験を実施した。その結果を Table 1 に示した。Table 1 より、各濃度レベルで得られた回収率は、87.0~96.0% と非常に良好な値を得ることが出来た。また、5 回繰り返し測定で本法の同時再現性を、4 日間に渡る測定で日差再現性を検証したところ、それぞれ、11% 及び 20% 以下となり、データの信頼性の面でも高い評価を行うことが出来た(Table 2)。

C-4. 直接競合 ELISA と GC 及び HPLC との相関性試験

確立した ELISA 条件を用い、HPLC 及び GC との相関性試験を実施した(Fig. 5)。濃度レベルを 5~500 ppb とし、確立した ELISA と GC 及び HPLC との相関性を検討したところ、双方には、非常に高い相関関係が認められた(GC : $r = 0.999$, HPLC : $r = 0.998$)。

D. 考察

直接競合 ELISA による迅速且つ簡便なイナベンフィド分析法の開発を試み、イナベンフィドの残留基準値近傍を感度及び精度について従来法である機器分析法と比較検討した。

玄米抽出液とメタノール標準溶液との吸光度の差は、いわゆるマトリックス効果に起因しているものと考えられた。マトリックス効果とは、玄米に由来した夾雑成分が直接競合 ELISA 中の抗原-抗体反応に影響し、双方の反応性に差が生じるという現象を示す。本研究で検討した玄米抽出液中イナベンフィドの測定において、このマトリックス効果を示していたことから、測定に影響を受けなくなるまで玄米抽出液を PBS により希釈する検討を考えた。しかし、イナベンフィドの場合、玄米に対する残留基準値が低く、抽出液の希釈倍率を 10 倍以上にすることで、基準値近傍の測定が難しくなると考えられた。そこで、試験溶液組成の検討、即ち、添加剤の検討を行った。本研究では、添加剤として界面活性剤 Tween 20 を選択した。0.1% (v/v) 以下の添加濃度において、何れのメタノール標準溶液中での反応性が上昇し、玄米抽出液との阻害曲線とほぼ一致する結果であった。この結果は、Tween 20 無添加の場合、メタノール標準溶液中における不十分な反応性の結果、

玄米抽出液との阻害曲線に解離が生じていることを示唆していると考えられた。

更に、確立した ELISA 条件をバリデーションした結果、非常に信頼性の高い結果を得ることが出来た。

これらの結果から、本研究で開発したイナベンフィドの ELISA は、玄米への適応に有用性が非常に高いと考えられた。

E. 結論

イナベンフィドを免疫化学的に測定することを目的として、確立した抗イナベンフィド MoAb を用いた直接競合 ELISA の条件検討を行った。厚生省告示法での分析法が非常に煩雑で時間を要するイナベンフィド分析法の代替法の検討を進めた。

0.1% (v/v) Tween 20 を添加することにより、玄米に由来した夾雑物成分の ELISA への影響を回避することが可能となった。更に、確立した ELISA 条件を用い、従来からイナベンフィドの理化学的試験法として使用されている GC/ECD 及び HPLC との相関性を検討した。その結果、双方の間には、非常に高い相関関係が認められた。今回、確立した ELISA 分析を用いることにより、検体処理時間を大幅に短縮し、更に、操作も非常に簡便であることから、同時検体処理能力の向上も可能となった。以上の結果から、玄米中イナベンフィドのスクリーニング分析法への応用が期待される。

F. 研究発表

津田祐理子、渡辺栄喜、加藤嘉代子、渡辺卓穂、中澤裕之、渡邊繁幸、堀田康司、伊東茂寿、湯浅洋二郎:免疫化学測定法による植物成長調整剤イナベンフィドの分析、日本食品衛生学会第 78 回学術講演会(1999 年 10 月、長野)

G. 参考文献

1. 白川憲夫、富岡博実、竹内正毅、市川 正:日本農薬学会誌 15、283-294 (1990).
2. Nakamura, K.:*Jpn. Pestic. Inf.* 51, 23-26 (1987).
3. 平成 5 年 3 月 4 日厚生省告示号外第 34 号.
4. 農薬残留分析法研究班 編、最新 農薬の残留分析法、中央法規出版、361-363.
5. 社団法人 日本植物防疫協会 編、最新 農薬の規制・基準値便覧、86-87.

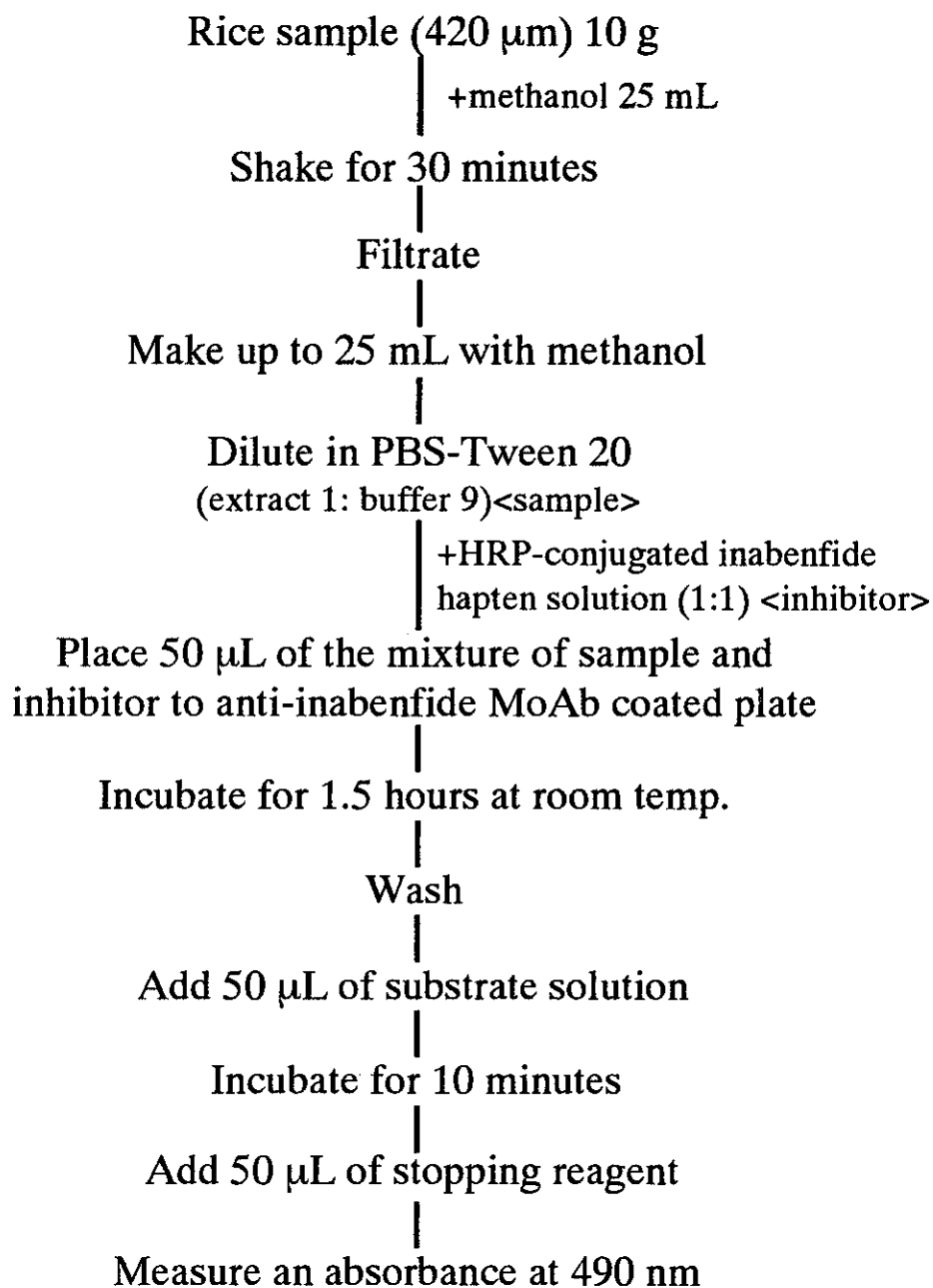


Fig. 1 Analytical procedure for inabenfide by the direct competitive ELISA

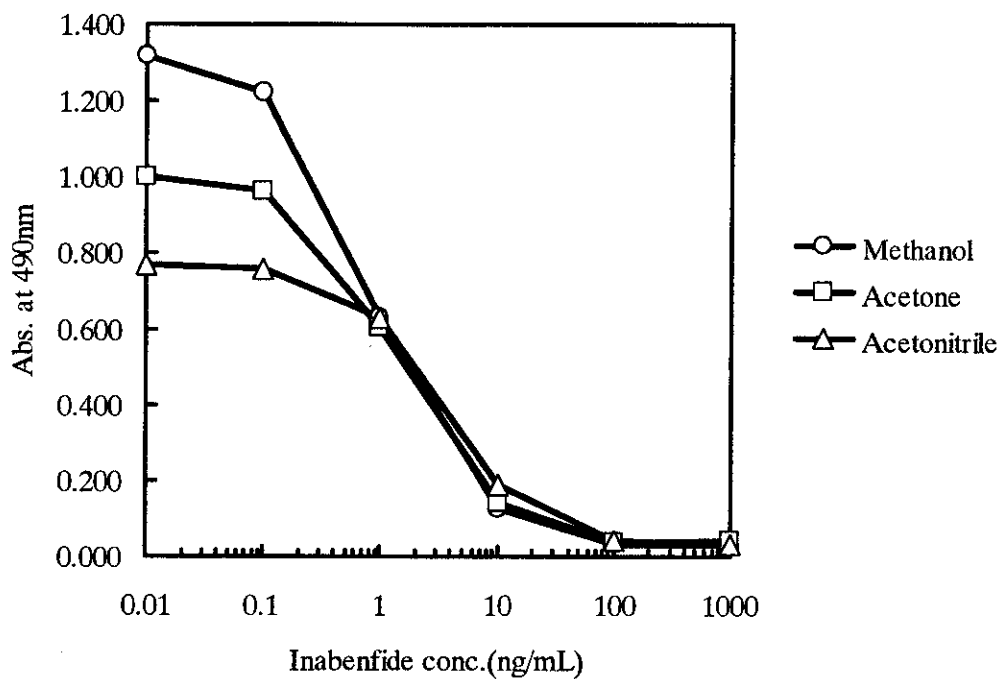


Fig. 2 Effects of various solvents used extraction procedure on reactivity and sensitivity of anti-inabenfide MoAb

IC₅₀ values were as follows :

Methanol : 0.9 ng/mL, Acetone : 3.7 ng/mL, Acetonitrile : 5.5 ng/mL

Each solvents concentration was 5% (v/v).

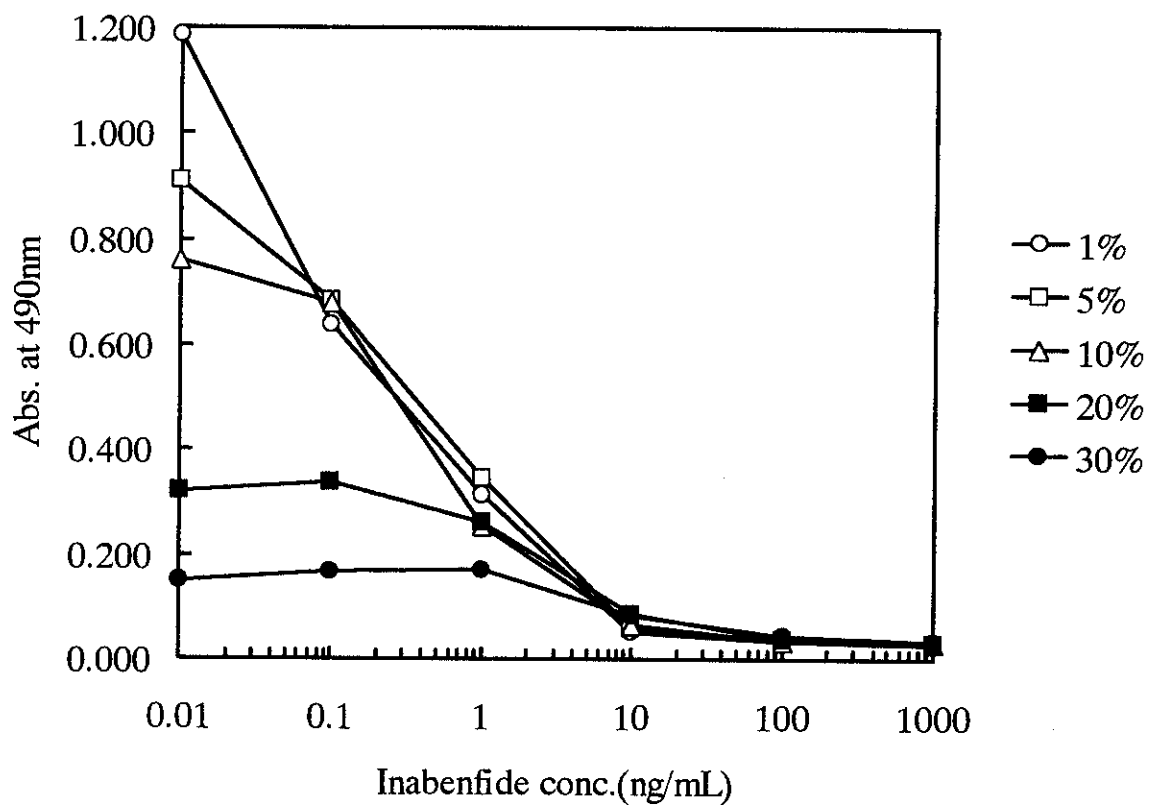


Fig. 3 Effect of methanol on reactivity and sensitivity of anti-inabenfide MoAb

IC₅₀ values were as follows :

1% : 0.3ng/mL, 5% : 0.7ng/mL, 10% : 0.9ng/mL, 20% : 5.5ng/mL, 30% : 10ng/mL

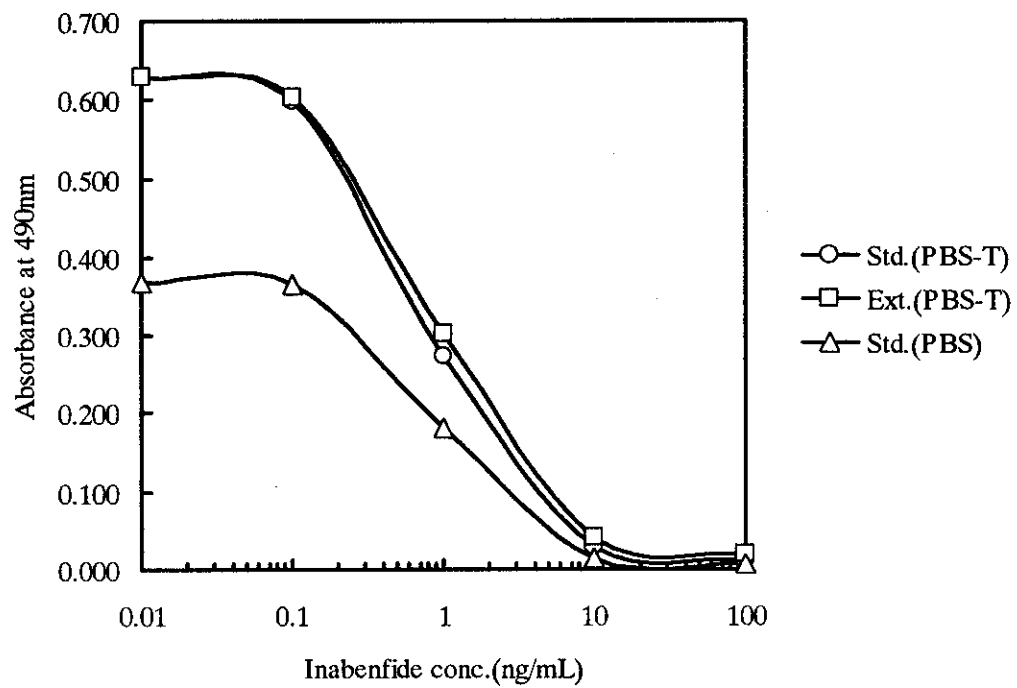


Fig. 4 Influence of rice matrix on the standard curve for inabenfide

○:PBS containing 0.1% (v/v) Tween 20 (0.1% PBS-T)

□:methanol extract of rice diluted in 0.1% PBS-T

△:PBS

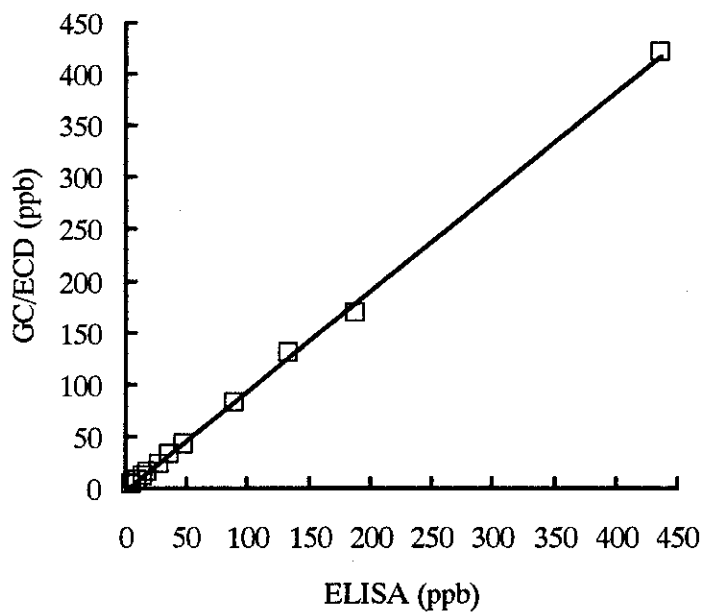
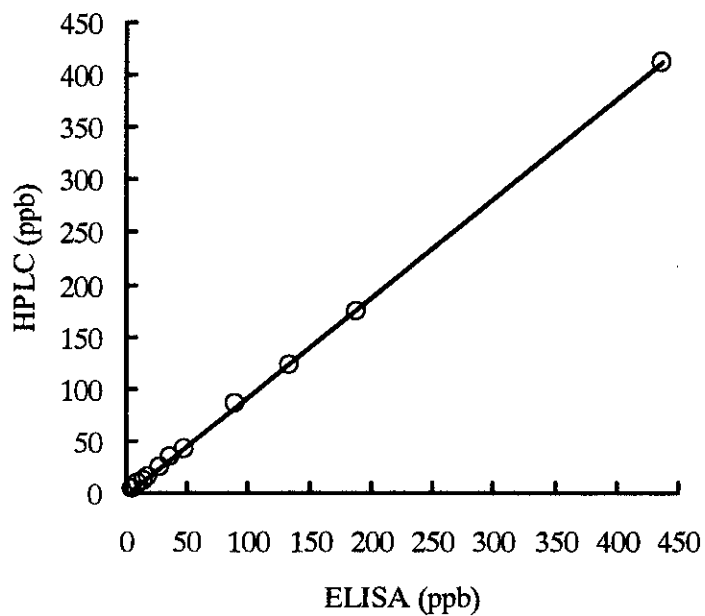


Fig. 5 Correlation between inabenfide concentrations in spiked rice samples as determined by the proposed ELISA and those determined by HPLC or GC/ECD methods

(Top) ELISA vs. HPLC

$n = 11, r = 0.998, y = 0.946x - 1.476$

(Bottom) ELISA vs. GC/ECD

$n = 11, r = 0.999, y = 0.967x - 3.065$

Table 1 Percentage recovery of inabenfide from rice sample

inabenfide spike level(ppb)	Mean	S.D.(ppb)	CV(%)	Recovery(%)
5	4.5	0.5	10.5	90.8
10	9.6	0.9	9.5	95.6
20	17.4	1.3	7.7	87.0
40	37.0	4.5	12.1	92.5
50	48.0	4.5	9.3	96.0
100	89.0	6.5	7.3	89.0
200	188.6	18.3	9.7	94.3
500	436.0	36.5	8.4	87.2

n=5 replicates

Table 2 Reproducibility of proposed ELISA for rice samples

inabenfide (ppb)	CV (%)	
	intra-assay ^a	interassay ^b
5	10.5	19.2
10	9.5	13.0
50	9.3	10.1
100	7.3	8.8
500	8.4	8.9

^a Percent coefficients of variation based on 5 determinations in 1 day.

^b Percent coefficients of variation based on 5 determinations performed 4 days.

分担研究報告書

農薬免疫アッセイと機器分析の比較評価に関する研究

(2) ピリミカーブ免疫化学的測定法の開発 (2)

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
(2) ピリミカーブ免疫化学的測定法の開発 (2)

分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学 教授

研究要旨

昨年度に基礎的な測定系を組み立てた殺虫剤ピリミカーブの免疫化学測定法について、農産物での添加回収試験ならびに機器分析法との比較試験を実施した。本研究において、野菜・果実を対象とした添加回収試験では 91~108% の良好な回収率が得られ、現行の GC/NPD との比較試験では両方法に非常に高い相関関係が認められた。これにより、本法が食品中のピリミカーブ残留分析法として高い有用性を有することが示された。

研究協力者

湯浅洋二郎 (株)環境免疫技術研究所
研究開発本部長

A. 研究目的

カーバメート系農薬であるピリミカーブは、アブラムシに即効性をもつ殺虫剤として有効であり、リンゴ、モモ、ウメ、ミカン、キュウリ、ナス、トマト、ダイコン、キャベツ、ジャガイモ、バラ、キク、タバコと幅広い作物で散布されている。そこで、感度として 34ng/ml の IC50 値をもつ免疫化学測定系を前年度に組み立て、残留分析への応用基盤を整えたことから本年度は、ピリミカーブが幅広く散布されている野菜・果実での適用可能性を評価するため、添加回収試験を行うとともに、告示法である GC 分析との比較試験を実施し、構築した免疫化学測定法の有用性を検証した。

B. 研究方法

B-1. 試薬及び試液

ピリミカーブ標準品は、関東化学社製環境分析用標準品(純度:97.0%以上)を用いた。

ピリミカーブ標準原液は、メタノールに溶解した(1 mg/mL)ものを ELISA 用、アセトンに溶解した(1000 ppm)ものを機器分析用としてそれぞれ用いた。

各種有機溶媒、カラムクロマトグラフィー用

シリカゲル及びその他の試薬類は、全て和光純薬工業社製特級試薬を用いた。3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジンはシグマ社製、液状ブロックエースは、大日本製薬社製を用いた。

ポリスチレン製 96 ウェルマイクロタイタープレートは、マシク社製を用いた。

B-2. 装置

96 ウェルマイクロタイタープレートの吸光度測定には、バイオテック社製マイクロプレートリーダー BL340 を用いた。

GC/NPD の測定には、Hewlett-Packard 社製ガスクロマトグラフ 5890II を用いた。分析カラムには、RTX-200 (30m×0.25 mm、膜厚 0.25 μm、Restek Co.製)を、カラム温度は 280°C、検出器温度は 280°C、注入口温度は 250°C に設定し、2 μL を注入して分析した。

B-3. 直接競合 ELISA

ピリミカーブ免疫化学測定法には、前年度の研究報告書に従い、直接競合 ELISA 法を用いた。ELISA 法の構成剤であるピリミカーブハプテン- HRP 結合体ならびにモノクローナル抗体の調製はすべて前年度報告書に従って行った。直接競合 ELISA 法の操作手順も同報告書に従って行った。

B-4. ELISA 用試験溶液

野菜の調製法

測定対象農産物には、野菜類からトマトを、果実類からリンゴを選択した。上記作物を細切

して、その 10 g を秤量し、ピリミカーブのメタノール溶液 30 ml を添加した後、ワーリングブレンダーで磨砕、30 分間振とうし、ガラスフィルターでろ過してメタノール抽出液を調製した。この抽出液を 20%メタノールになるよう希釈して ELISA 用試料とした。

B-5. 機器分析比較試験用試料の調製法

細切した農産物 20 g を秤量し、ピリミカーブのメタノール溶液を添加した後、60 ml のメタノールを加え、ワーリングブレンダーで磨砕、30 分間振とうし、吸引ろ過して得たる液を抽出試料とした。これを 2 分して、一部は希釈して ELISA 測定用、もう一部は機器分析 (GC) 用とした。GC にかける試料のクリーンアップは告示法の手順に従って行った。

C. 研究結果

C-1. 農産物抽出液の直接競合 ELISA への影響

ELISA 用試験溶液には、農産物由来の夾雑成分が影響を及ぼすことが考えられることから、農産物抽出液に既知濃度のピリミカーブを添加し、メタノール標準溶液から得られた阻害曲線との比較により、夾雑成分の ELISA への影響に関して検討した。その結果、メタノール標準溶液と作物抽出液の阻害曲線は、ほぼ一致し (図 1)、夾雑成分の影響を受けない測定系であることが確認された。

C-2. 添加回収試験

確立した ELISA 条件に基づき、ピリミカーブが基準値、基準値の 1/2 及び 1/5 の濃度レベルになるように添加した模擬検体を用いて、添加回収試験を行った。その結果を表 1 に示した。表 1 より、各濃度レベルで得られた回収率は、両農産物をあわせて 91.0~108% と非常に良好な値を得ることが出来た。

C-3. 直接競合 ELISA と GC との相関性試験

確立した ELISA 測定条件を用い、GC との比較試験を実施した。濃度水準は添加回収試験と同様とした。

確立した ELISA と GC の相関性を分析したところ、相関係数はトマトで 0.99、リンゴで 1.00、回帰直線の傾きはトマトで 0.99、リンゴで 0.96

と、双方に、非常に高い相関関係が認められた (図 2)。

D. 考察

直接競合 ELISA 法による迅速かつ簡便なピリミカーブ残留分析法の開発を試み、ピリミカーブの残留基準値付近の感度について、添加回収試験と、現行の機器分析 (GC) 法との比較試験を行って検討した。

農産物抽出液、メタノール標準溶液の各標準曲線とが乖離することなく一致したことから、開発の方法が農産物の影響を受けることなく、残留分析に適用できる可能性を示した。

更に、確立した免疫化学的手法と、告示法との比較試験に基づくバリデーションの結果、非常に信頼性の高い結果を得ることが出来た。

これらの結果から、本研究で開発したピリミカーブの免疫化学測定法 (直接競合 ELISA) は農産物、特に野菜・果実類への適用に有用性が非常に高いと考えられた。

E. 結論

前年度に基礎構築したピリミカーブ免疫化学測定法について、農産物への適用を図ることを目的に、野菜・果実類での添加回収試験ならびに機器分析法との比較試験を実施して、農産物における適用の可能性を検証した。

農産物試料において、100%前後の高い回収率、ならびに GC 法との高い相関性ことから、農産物におけるピリミカーブ残留分析に有用であることが確認された。

今回、確立した ELISA 分析を用いることにより、検体処理時間を大幅に短縮し、更に、操作も非常に簡便であることから、同時検体処理能力の向上も可能となった。以上の結果から、ELISA 分析による農産物中ピリミカーブのスクリーニング分析法への応用が期待される。

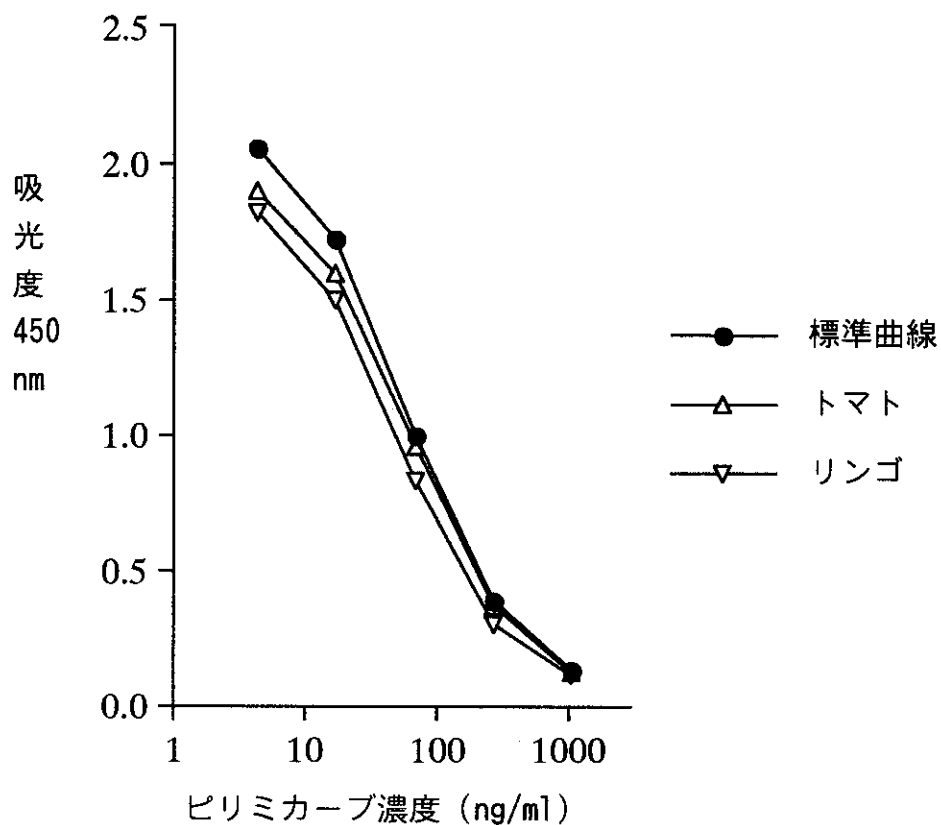


図1 トマト、リンゴ抽出液に添加したピリミカーブの反応性 (直接競合 ELISA 法)

表1 直接競合ELISA法によるピリミカーブ添加野菜の測定結果

種類	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)		
		No. 1	No. 2	No. 3
トマト	0.2	93	98	91
	0.5	94	97	97
	1.0	100	98	97
リンゴ	0.2	107	108	108
	0.5	106	104	106
	1.0	91	98	101

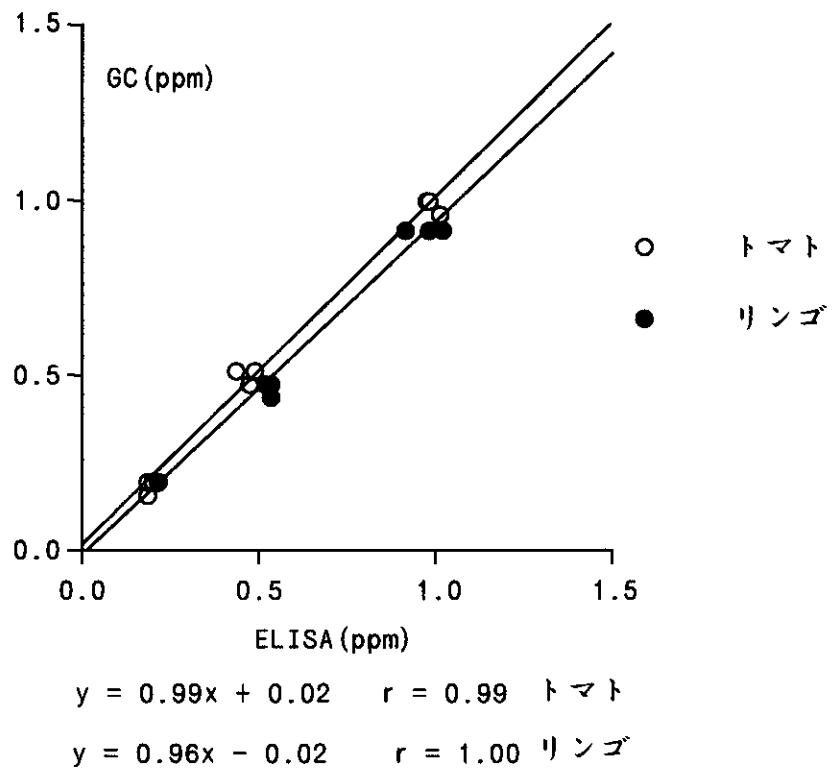


図2 ピリミカール添加野菜を用いた場合の直接競合ELISA法と機器分析の相関

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

本研究では、競合ELISA法を利用した市販の残留農薬測定キットのなかで、磁気ビーズタイプのクロルピリホスキットとマイクロウェルタイプのアルジカルブキットの有用性について検討した。両キットとも、使用可能な有機溶剤や交差反応性を示す農薬などに配慮すべき所はあるが、スクリーニング法としては有効な手段となりうることが示唆された。

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
野村孝一 (財)日本食品分析センター
上野英二 愛知県衛生研究所

一方、結果の変動が大きいことや他の農薬でも認識してしまう交差反応性などの問題点も指摘されている。ELISA法が認められるためには、機器分析と同様に、測定値の精度や感度などが一定の基準をクリアする必要がある。

そこで、本年度は、磁気ビーズタイプのクロルピリホスとマイクロウェルタイプのアルジカルブキットについて測定を行い、その有用性について検討したので報告する。

A. 研究目的

農産物中の残留農薬を分析機器を用いて測定するためには、検出の前に農薬の抽出と抽出される試料の夾雑物を取り除くための複雑な精製が必要となる。

このため、国内外産農産物の流過程における残留農薬の検査がそれらの流通実態を反映しているか否か疑問がある。近年、これらの現場で残留農薬を簡単に分析する方法としてイムノアッセイキットを用いた測定方法が注目されている。

市販されているイムノアッセイキットのほとんどは競合酵素免疫法(競合ELISA法)を利用したものである。抗体をコーティングした固相は、試験管またはマイクロウェル、磁気ビーズ、ラッセクスなどと異なるが、共通点は操作が簡便であること、高価な機器を使用しないこと、測定時間が短いなどの特徴を持っている。

B. 研究方法

1. キット

i) クロルピリホス

クロルピリホスに対しては、RaPID Assay[®] キット(SDI社製造、USA)を用いた。このキットの抗体は、微細な磁性体に吸着されており、抗体の分離は専用の磁気ラックを必要とするが、磁性体が溶液中に自然に浮遊するため、抗体をチューブ等にコーティングしてある製品と比較してバラツキが少なく、高い精度と再現性が得られるといわれる。また、保存面でも抗体が溶液中にあるため安定性が高く12ヶ月以上安定であるともいわれる。

キット内容

①抗体コーティング磁性体溶液(抗体)

②酵素標識抗原

③抗原標準溶液

④抗原基準品 キット使用時に一緒にテストに