

用い、結果がバイアルの表示範囲内であることにより、試薬の有効性を確認する。

⑤陰性コントロール液

⑥発色液

⑦反応停止液

⑧洗浄液

⑨チューブ

ii) アルジカルブ

アルジカルブの測定キットは、エンバイロガード（SDI社製造、USA）のウェルタイプを使用した。このキットは昨年度、陰性コントロール液であっても吸光度が非常に低く、実用には供することができなかつたキットのロットを変えたものである。

キットの内容

①マイクロタイタープレート（12ウェル×8ストリップ）

②酵素複合体液

③陰性コントロール液

④基質液

⑤発色液

⑥反応停止液

2. 試薬

メタノール、アセトン、アセトニトリル：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 pH7.2~7.4

農薬標準品：和光純薬工業（株）または林純薬工業（株）の残留農薬試験用試薬

3. 装置

吸光度計（セティ社製ハンディーフォトメーター Model-6 測定波長450nm）

磁気ラック（上部はチューブラック、下部は磁石ユニットからなる）

4. キットの操作

i) クロルピリホスキット

①キットのすべての試薬および試験溶液を室温とする。

②試験溶液、抗原標準溶液、抗原基準品250 μ Lを各チューブに分注する。

③すべてのチューブに酵素標識抗原を250 μ L分注する。

④磁性体が入ったバイアル（抗体コーティング磁性体溶液）をよく振り、内容物を攪拌した後、す

べてのチューブに500 μ L分注する。

⑤室温で15分間インキュベートする。

⑥磁気ラックに全チューブを取り付け、2分間抗体の分離を行う。

⑦磁気ラックにチューブを取り付けたまま、溶液を捨てる。

⑧洗浄液1mLを各チューブに分注し、2分間放置した後、溶液を捨てる。この操作をもう一度繰り返す。

⑨チューブラックを磁石ユニットから取り外した後、各チューブに発色液を500 μ L分注する。

⑩室温で20分間インキュベートする。

⑪反応停止液を500 μ L分注する。

⑫15分以内に吸光度（450nm）を測定する。

結果は下式より% B/B₀を算出し、縦軸に% B/B₀、横軸に対数目盛で農薬濃度を表した検量線を作り、試料溶液のクロルピリホス濃度を算出する。

$$\% B/B_0 = \frac{\text{各チューブの吸光度}}{\text{陰性コントロール液の吸光度}} \times 100$$

ii) アルジカルブキット

①使用したい分のストリップだけ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残留農薬試験用のアルジカルブより各濃度の標準液を調製する。

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酵素複合体溶液を各ウェルに加え混合する。

⑤室温で1時間インキュベートする。

⑥ウェルの中身を捨てた後、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。

⑦基質液を各ウェルに滴下する。

⑧発色液を滴下する。

⑨室温で30分間インキュベートする。

⑩30分経過後、各ウェルに反応停止液を加え、よくかき混ぜる。

⑪30分以内にマイクロプレートリーダーで吸光度（450nm）を測定する。

結果はクロルピリホスと同様に% B/B₀を算出し、農薬濃度を算出する。

5. 溶媒の影響

農産物からの農薬の抽出には、有機溶媒による方法が一般に抽出効果が高い。しかし、有機溶媒が多いとキットの発色に影響を及ぼすことになる。そこで、クロルピリホスキットについてはメタノール、アセトン、アセトニトリルについて、アルジカルブキットについてはメタノールとアセトンについてその影響を検討した。

6. 交差反応性

i) クロルピリホスキット

クロルピリホスキットについては主に有機リン系農薬に関する交差反応性を求めた。その方法は、各農薬の1.0~1000ng/ml (10% MeOH/PBS) の溶液を調製し、その% B/B₀を指針として検討した。

ii) アルジカルブキット

アルジカルブキットについてはアルジカルブの酸化代謝物や構造的に類似した農薬を選び、ppbレベルおよびppmレベルで交差反応性を求めた。

7. 添加回収試験

クロルピリホスについては野菜、果実を試料として、その回収率を求めた。

その方法は、試料10gにクロルピリホス250ngを添加してから2時間放置する。メタノール40mlを添加して30分間振とう後、5分間放置する。この上澄み1mlを10ml試験管にとり、PBSで10倍に希釈する。この溶液をミリポア社製サンプルブ (孔径0.5μm) でろ過し試験溶液とした。

C. 研究結果および考察

1. キットの精度について

i) クロルピリホスキット

抗原標準溶液の濃度チェックのため、農薬標準品のクロルピリホスから抗原標準溶液に表示された濃度を作成し、比較を行った。

表1に示す通り、抗原標準溶液は農薬標準品と同一の% B/B₀を示し、問題はなかった。

キットの保存性および再現性をみるため、抗原標準溶液 (10%MeOH/PBS) より求めた検量線を4日間比較した。図1に示す通り、検量線の傾き

はほとんど変化せず、良好な直線性を示したが、測定ごとの% B/B₀には変動があり、測定ごとに検量線の作成が必要であった。

検出限界は、% B/B₀が90%を示す値とするならば0.15~0.20ppbであった。この値は、クロルピリホスの残留基準が0.01~3.0ppmである¹⁾ことから、十分な検出限界といえる。

ii) アルジカルブキット

アルジカルブキットには農薬の抗原標準液がセットされていないので、残留農薬標準品のアルジカルブを水で希釈して1.0~2000ppbの範囲の検量線を作成した (図2)。作成した検量線は、変動幅がやや広いが、ほぼ直線性を示した。なお、検出限界は、0.5~1.0ppbと考えられる。この値は、アルジカルブの残留基準が0.02~0.50ppmである¹⁾ことから、十分な検出限界といえる。

2. 抽出溶媒の影響

i) クロルピリホスキット

溶媒無添加PBSと有機溶媒含有PBSを比較すると、90% B/B₀が得られるのはメタノールでは20%、アセトンでは5%、アセトニトリルでは5%までであった (表2)。次に、有機溶媒のなかで影響の少なかったメタノールにおけるクロルピリホス測定に対する影響について検討するため、陰性コントロールと3ppb標準液を各メタノール濃度で作成した。

図3にみられるようにメタノール濃度の影響は、陰性コントロールの発色に大きく影響し、使用に際しては、メタノール濃度は20%が限界と思われた。

ii) アルジカルブキット

アルジカルブキットに対するメタノールとアセトンの影響を図4に示した。このキットに対する有機溶媒の影響は大きく、メタノールでは5%、アセトンにおいては使用することが不可能であった。

3. 交差性について

i) クロルピリホスキット

クロルピリホスキットの交差反応性について表3に示した。

検討した農薬のうちダイアジノン、クロルピリホスメチル、ピリダフェンチオンに大きな交差反応性がみられた。陰性コントロールに対する50% B/B₀に相当する濃度でみるとダイアジノン、ク

クロルピリホスメチルが2/3、ピリダフェンチオンが1/3、ジクロフェンチオンが1/20であった。

ダイアジノンには、多くの農産物に使用されており注意が必要である。昨年度検討したダイアジノンキット（ウェルタイプ）はクロルピリホスに対して交差反応性がないことから、このキットで陽性結果がでた場合、ダイアジノンキットで再度検討することも一案である。

ii) アルジカルブキット

アルジカルブキットではアルジカルブの酸化代謝物であるアルジカルブスルホンとアルジカルブスルホキシド（図5）に交差反応性がみられた（表4）。また、その他の農薬ではプトカルボキシム、プトキシカルボキシム、メチオカルブ、メチオカルブスルホンに交差反応性がみられたが、付加した濃度が高いことから、農産物の実際の測定ではほとんど影響しないものと思われる。

4. 添加回収試験

i) クロルピリホスキット

クロルピリホス無添加の結果をみるとブロッコリー、かぼちゃ、グレープフルーツが% B/B₀に低い値を示した（表5）。そこで、これらについてGCで測定したところ、かぼちゃからは1ppb、グレープフルーツからは17ppbのクロルピリホスが検出されたが、ブロッコリーからは検出されなかった。回収率では、グレープフルーツが低い値を示したが、他の農産物は80%以上の良好な回収率を示した。グレープフルーツの結果が低いのは、果実中にクロルピリホスが含まれていたことによるものか今後検討したい。

D. 結論

市販のイムノアッセイキットのなかで競合ELISA法を利用した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について、その有用性を検討した。

クロルピリホスキットは検出感度が高く、保存性および再現性も良かったが、交差反応性のうえでは、反応する農薬があり、精度のうえではやや問題があった。しかし、逆にいえば初期のスクリーニングとしては、測定時間が短いことから有効な手段となりうる。

アルジカルブキットについては検出感度が高

く、交差反応性を示す他の農薬も少ないことから、十分実用に供されることが示唆されたが、今回は、実際の農産物に対する添加回収を行っていないので、今後検討を進める予定である。

参考文献

- 1) 日本食品衛生学会：食品衛生雑誌，40(1)，J44-J99(1999).
- 2) 農薬残留分析法研究班：最新農薬の残留分析法，p34，中央法規出版（1995）.

表1 クロルピリホスキッドの抗原標準溶液と農業標準品の比較

濃度(ppb)	抗原標準溶液				クロルピリホス			
	1	2	平均	%B/B ₀	1	2	平均	%B/B ₀
0	1.503	1.480	1.492	—	1.526	1.467	1.497	—
0.22	1.153	1.203	1.178	79.0	1.220	1.133	1.177	78.6
1.0	0.704	0.713	0.709	47.5	0.712	0.704	0.708	47.3
3.0	0.353	0.367	0.360	24.1	0.535	0.454	0.495	33.0

表2 クロルピリホスキッドに対する有機溶媒の影響

有機溶媒 濃度(%)	MeOH/PBS		Acetone/PBS		MeCN/PBS	
	吸光度	%B/B ₀	吸光度	%B/B ₀	吸光度	%B/B ₀
0	1.627	—	1.627	—	1.627	—
5	1.623	99.8	1.598	98.2	1.619	99.5
10	1.588	97.6	1.29	79.3	1.42	87.3
20	1.528	93.9	0.448	27.5	0.746	45.9
30	1.292	79.4	0.35	21.5	0.291	17.9
40	0.857	52.7	—	—	—	—
50	0.864	53.1	—	—	—	—

表3 クロルピリホスキッドに対する各種農薬の交差反応性

	1000ng/mL	100ng/mL	20ng/mL	3ng/mL	1ng/mL (%B/B ₀)	50%B/B ₀ (ppb)
クロルピリホス	14.0	19.6	15.7	41.3	63.8	2.0
ダイアジノン	9.9	28.4	35.4	50.0	79.5	3.0
クロルピリホスメチル	9.1	28.9	32.6	52.3	79.9	3.2
ピリダフェンチオン	10.5	16.6	26.3	62.0	80.4	5.7
ジクロフェンチオン	19.2	39.1	58.2	91.9	—	38
ピリミホスメチル	18.6	66.7	77.5	>100	—	240
ジスルホトン	30.0	82.9	86.6	96.4	—	420
テルブホス	67.4	98.2	82.3	>100	—	>1000
エチオン	59.6	88.9	92.2	—	—	>1000
ピリミホスエチル	57.7	94.6	97.0	—	—	>1000
パラチオン	51.7	99.8	97.1	—	—	>1000
エトプロホス	80.1	91.9	—	—	—	>10000
キナルホス	79.7	95.5	—	—	—	>10000
イソキサチオン	78.1	96.9	—	—	—	>10000
フェントロチオン	82.0	>100	—	—	—	>10000
プロチオホス	86.3	98.4	—	—	—	>10000
シアノニホス	88.9	>100	—	—	—	>10000
スルプロホス	99.1	>100	—	—	—	—
エジフェンホス	>100	—	—	—	—	—
トリクロピル	>100	—	—	—	—	—
ジクロルボス	>100	—	—	—	—	—
テトラジホン	>100	—	—	—	—	—
2,4,5-T	>100	—	—	—	—	—
クロルフェンビンホス	>100	—	—	—	—	—

表4 アルジカルブキッドに対する各種農薬の交差反応性

農薬名	濃度	%B/B ₀ の平均値	
アルジカルブスルホン	10ppb	63.3	
	50ppb	45.0	
アルジカルブスルホキッド	0.1ppm	48.3	
	0.5ppm	26.7	
	1.0ppm	21.8	
オキサミル	10ppm	105.2	
チオジカルブ		84.4	
ブトカルホキシム		50.9	
ブトキシカルホキシム		53.2	
メソミル		116.0	
メソミルオキシム		113.6	
イソプロカルブ(MIPG)	10ppm	99.4	
エチオフェンカルブ		111.2	
エチオフェンカルブスルホキッド		119.2	
エチオフェンカルブスルホン		115.0	
カルホフラン		104.0	
フェノブカルブ		102.0	
ベンダイオカルブ		102.7	
メチオカルブ		66.2	
メチオカルブスルホン		84.2	
メチオカルブスルホキッド		102.7	
MTMC		90.1	
XMC		88.2	
アトラジン		10ppm	116.7
カフェンストロール			113.1
キサロホップエチル	111.9		
シマジン	117.4		
セトキシジム	122.7		
ダイムロン	102.7		
テニルクロール	115.7		
ベンスルフロンメチル	117.2		
ベンタゾン	95.9		
ニテンピラム	10ppm		121.0

表5 クロルピリホスキットにおける農産物の結果と回収率

	無添加				クロルピリホス 25ppb添加				回収率 (%)
	1	2	平均	%B/B ₀	1	2	平均	%B/B ₀	
ブロッコリー	1.096	1.092	1.094	85.7	0.740	0.717	0.729	57.0	96
なす	1.182	1.253	1.218	95.3	0.818	0.818	0.818	64.1	100
かぼちゃ	0.944	0.941	0.943	73.8	0.673	0.677	0.675	52.9	80
ほうれんそう	1.185	1.247	1.216	95.2	0.871	0.845	0.858	67.2	88
トマト	1.241	1.216	1.229	96.2	0.868	0.863	0.866	67.8	86
りんご	1.330	1.324	1.327	103.9	0.855	0.87	0.863	67.5	88
グレープフルーツ	0.908	0.900	0.904	70.8	0.714	0.689	0.702	54.9	52
レモン	1.258	1.250	1.254	98.2	0.804	0.853	0.829	64.9	96
メロン	1.268	1.267	1.268	99.3	0.876	0.898	0.887	69.5	82
オレンジ	1.278	1.269	1.274	99.7	0.898	0.884	0.891	69.8	80

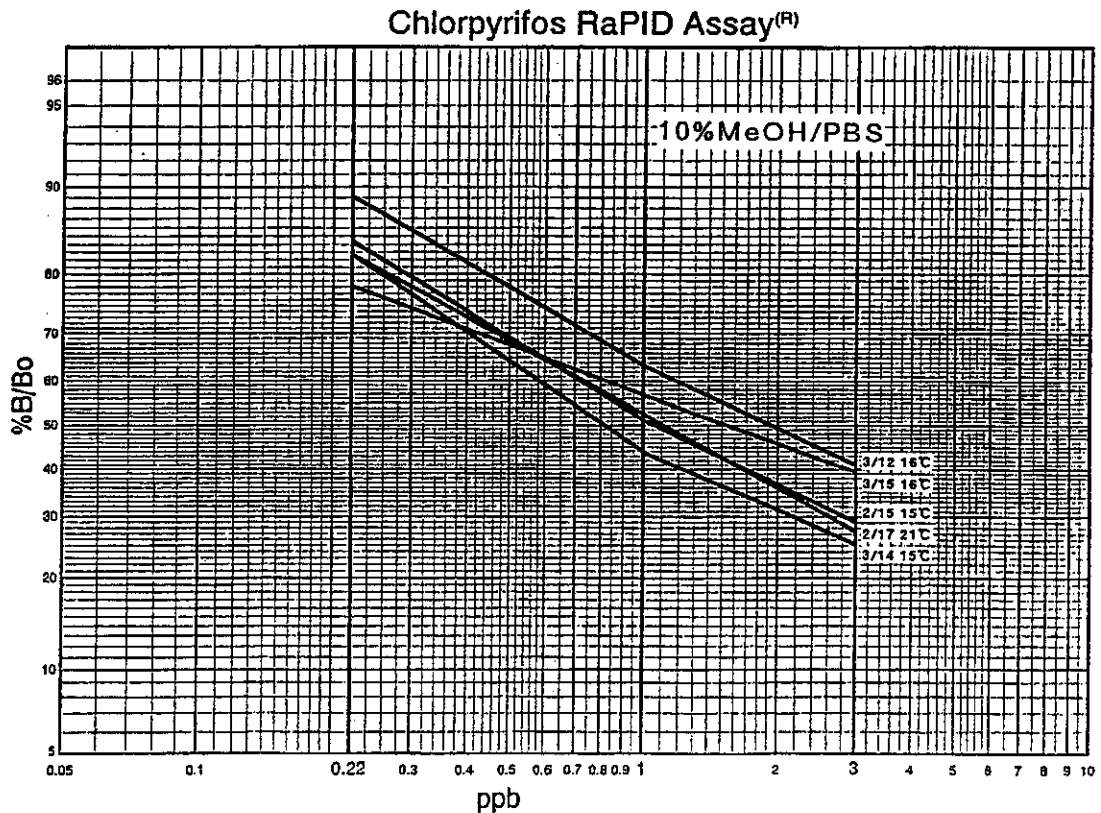


図1 クロルピリホスの検量線

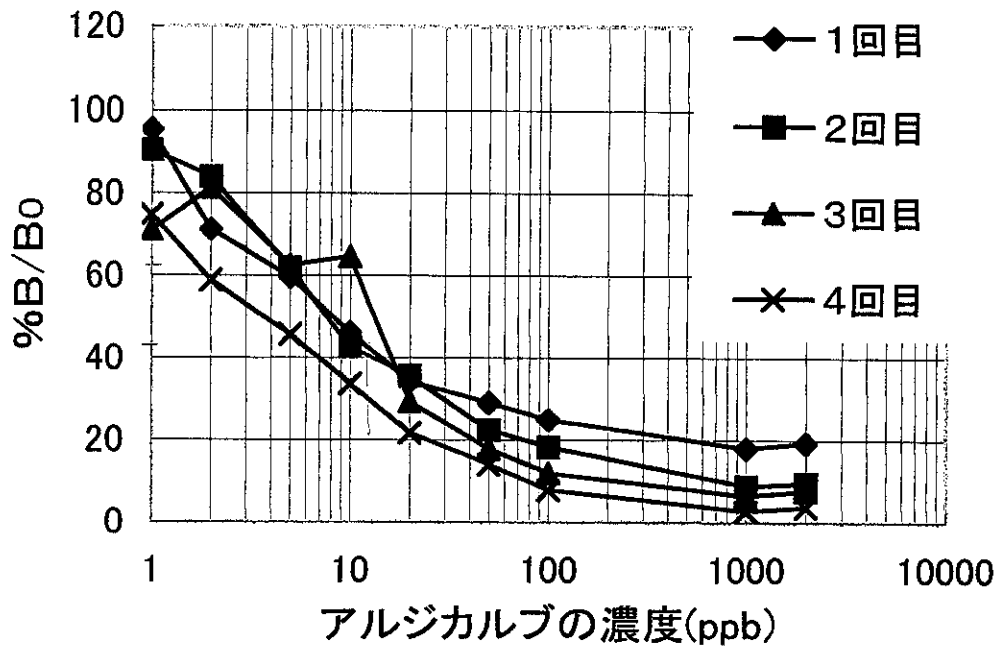


図2 アルジカルブの検量線

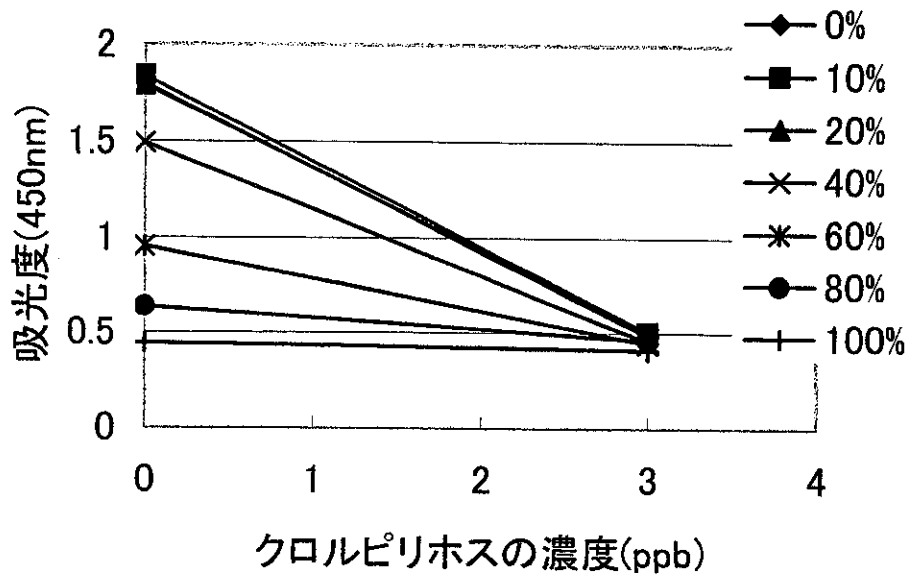


図3 クロロフィルaキットに対するメタノールの影響

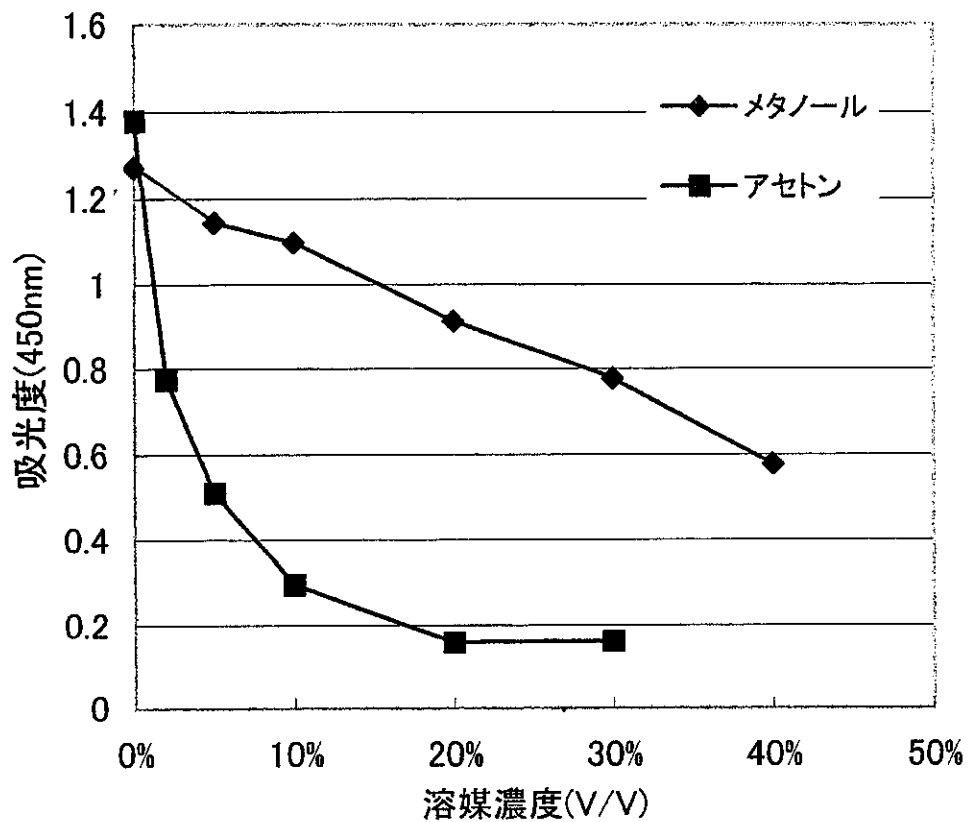


図4 アルジカルブキットに対する有機溶媒の影響

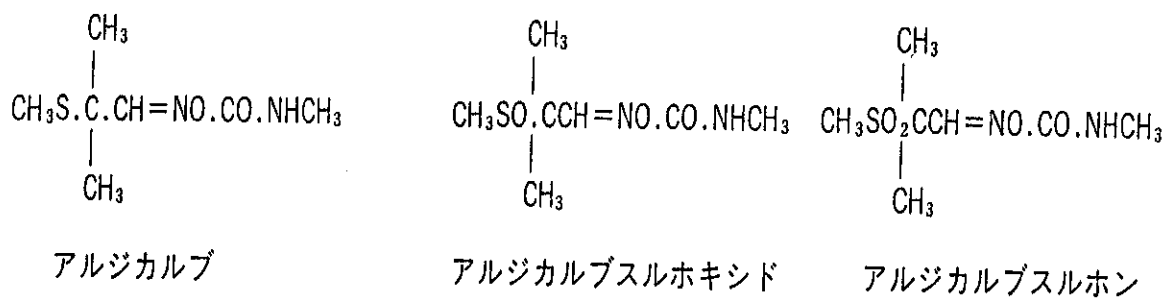


図5 アルジカルブとその代謝物²⁾