

表 1. 測定対象農薬の性状

農 薬	CAS RN	分子式	分子量	水溶解度(mg/L)
N-メチルカルバメート系農薬				
アルジカルブ	[116-06-3]	$C_7H_{14}N_2O_2S$	190.3	4930(pH7, 20°C)
イソプロカルブ(MIPC)	[2631-40-5]	$C_{11}H_{15}NO_2$	193.2	265
オキサミル	[23135-22-0]	$C_7H_{13}N_3O_3S$	219.3	280000(25°C)
カルバリル(NAC)	[63-25-2]	$C_{12}H_{11}NO_2$	201.2	120(20°C)
キシリルカルブ(MPMC)	[2425-10-7]	$C_{10}H_{13}NO_2$	179.2	580(20°C)
チオジカルブ	[59669-26-0]	$C_{10}H_{18}N_4O_4S_3$	354.5	35(25°C)
ピリミカーブ	[23103-98-2]	$C_{11}H_{18}N_4O_2$	238.3	3000(pH7.4, 25°C)
フェノブカルブ(BPMC)	[3766-81-2]	$C_{12}H_{17}NO_2$	207.3	420(20°C)
プロボキスル(PHC)	[114-26-1]	$C_{11}H_{15}NO_3$	209.2	1900(20°C)
ベンダイオカルブ	[22781-23-3]	$C_{11}H_{13}NO_4$	223.2	280(pH7, 20°C)
メソミル	[16752-77-5]	$C_5H_{10}N_2O_2S$	162.2	57900(25°C)
メチオカルブ	[2032-65-7]	$C_{11}H_{15}NO_2S$	225.3	27(20°C)
メトルカルブ(MTMC)	[1129-41-5]	$C_9H_{11}NO_2$	165.2	2600(30°C)
XMC	[2655-14-3]	$C_{10}H_{18}NO_2$	179.2	470(20°C)
スルホニルウレア系農薬				
アジムスルフロン	[120162-55-2]	$C_{13}H_{16}N_{10}O_5S$	424.4	1050(pH7, 20°C)
イマゾスルフロン	[122548-33-8]	$C_{14}H_{13}ClN_6O_5S$	412.8	308(pH7.0, 25°C)
エトキシスルフロン	[126801-58-9]	$C_{15}H_{18}N_4O_7S$	398.4	1353(pH7, 20°C)
クロルスルフロン	[64902-72-3]	$C_{12}H_{12}ClN_5O_4S$	357.8	31800(pH7, 25°C)
シクロスルフアムロン	[136849-15-5]	$C_{17}H_{19}N_5O_6S$	421.4	6.5(pH7, 25°C)
トリベヌロンメチル	[101200-48-0]	$C_{15}H_{17}N_5O_6S$	395.4	2040(20°C)
ピラゾスルフロンエチル	[93697-74-6]	$C_{14}H_{18}N_6O_7S$	414.4	14.5(20°C)
フラザスルフロン	[104040-78-0]	$C_{13}H_{12}F_3N_5O_5S$	407.3	2100(pH7, 25°C)
ベンスルフロンメチル	[83055-99-6]	$C_{16}H_{18}N_4O_7S$	410.4	120(pH7, 25°C)
メトスルフロンメチル	[74223-64-6]	$C_{14}H_{15}N_5O_6S$	381.4	2790(pH7, 25°C)
その他の農薬				
イマザリル	[35554-44-0]	$C_{14}H_{14}Cl_2N_2O$	297.2	180(pH7.6, 20°C)
ジメトモルフ	[110488-70-5]	$C_{21}H_{22}ClNO_4$	387.9	<50(20-23°C)
ダイムロン	[42609-52-9]	$C_{17}H_{20}N_2O$	268.4	1.2(20°C)

表 2. LC/MS測定イオン

農 薬	測定イオン(m/z)	農 薬	測定イオン(m/z)
アルジカルブ	Na ⁺ 213.3	アジムスルフロン	H ⁺ 425.4
イソプロカルブ	H ⁺ 194.2	イマゾスルフロン	H ⁺ 413.8
オキサミル	Na ⁺ 242.3	エトキシスルフロン	H ⁺ 399.4
カルバリル	H ⁺ 202.2	クロルスルフロン	H ⁺ 358.8
キシリルカルブ	H ⁺ 180.2	シクロスルファムロン	H ⁺ 422.4
チオジカルブ	H ⁺ 355.5	トリベヌロンメチル	H ⁺ 396.4
ピリミカーブ	H ⁺ 239.3	ピラゾスルフロンエチル	H ⁺ 415.4
フェノブカルブ	H ⁺ 208.3	フラザスルフロン	H ⁺ 408.3
プロボキスル	H ⁺ 210.2	ベンスルフロンメチル	H ⁺ 411.4
ベンダイオカルブ	H ⁺ 224.2	メトスルフロンメチル	H ⁺ 381.4
メソミル	H ⁺ 163.2	イマザリル	H ⁺ 298.2
メチオカルブ	H ⁺ 226.3	ジメトモルフ	H ⁺ 388.9
メトルカルブ	H ⁺ 166.2	ダイムロン	H ⁺ 269.4
XMC	H ⁺ 180.2		

表 3. N-メチルカルバメート系農薬の回収結果

	oxamyl	methomyl	thiodicarb	MTMC	bendiocarb	PHC	NAC	MPMC XMC	MIPC	pirimicarb	BPMC	methiocarb
米-1	59.0	82.3	84.8	66.3	80.2	68.5	59.2	81.8	73.5	76.9	74.2	118.1
米-2	99.3	46.5	62.7	52.4	82.6	57.9	51.3	78.5	78.9	77.4	66.6	100.8
米-3	84.0	58.3	77.5	55.8	104.1	71.3	51.7	74.2	62.3	76.8	72.8	98.4
Ave.	80.8	62.4	75.0	58.2	89.0	65.9	54.1	78.2	71.6	77.0	71.2	71.2
SD	20.34	18.24	11.26	7.25	13.16	7.07	4.45	3.81	8.47	0.32	4.04	4.04
CV(%)	25.19	29.25	15.01	12.46	14.79	10.73	8.23	4.88	11.83	0.42	5.68	5.68
ぶどう-1	89.2	83.4	131.7	131.6	139.7	132.7	119.5	161.2	143.8	135.4	140.7	168.4
ぶどう-2	47.4	71.8	97.7	94.0	119.1	101.7	91.6	123.9	119.9	110.2	108.7	116.6
ぶどう-3	93.0	70.3	117.7	90.4	161.0	107.5	110.7	135.1	120.9	109.6	101.8	96.1
Ave.	76.5	75.2	115.7	105.3	139.9	114.0	107.3	140.1	128.2	118.4	117.1	117.1
SD	25.30	7.17	17.09	22.82	20.95	16.48	14.26	19.14	13.52	14.73	20.76	20.76
CV(%)	33.06	9.54	14.77	21.66	14.97	14.46	13.30	13.66	10.55	12.44	17.73	17.73
りんご-1	78.9	48.9	63.0	53.2	53.1	53.5	64.0	64.7	73.0	62.5	54.2	103.6
りんご-2	72.6	58.2	66.4	48.6	68.8	85.8	94.8	83.1	76.9	66.4	64.7	100.4
りんご-3	62.1	55.3	60.9	36.6	64.8	54.4	63.9	57.6	65.5	65.8	55.4	101.6
Ave.	71.2	54.1	63.4	46.1	62.2	64.6	74.2	68.5	71.8	64.9	58.1	58.1
SD	8.49	4.76	2.78	8.57	8.16	18.39	17.81	13.16	5.79	2.10	5.75	5.75
CV(%)	11.92	8.79	4.38	18.58	13.11	28.49	23.99	19.22	8.07	3.24	9.89	9.89

表 4. スルホニルウレア系農薬等の回収結果

	chlorsul- furon	metsulfu- ron methyl	azimsulfu- ron	ethoxysul- furon	imazasal- furon	pyrazosul- furon ethyl	flazasal- furon	tribenuron methyl	bensulfu- ron methyl	cyclosulfa- muron	daimuron	回収率(%)
米-1	122.3	115.6	68.2	106.1	91.0	91.3	126.4	92.7	85.2	106.5	89.8	
米-2	38.2	61.0	76.3	83.2	75.0	71.4	75.9	60.5	73.1	102.6	88.8	
米-3	106.0	136.0	131.9	128.0	123.4	115.7	139.6	74.6	95.0	117.3	124.7	
Ave.	88.8	104.2	92.1	105.8	96.5	92.8	114.0	75.9	84.4	108.8	101.1	
SD	44.60	38.78	34.68	22.40	24.66	22.19	33.62	16.14	10.97	7.62	20.44	
CV(%)	50.21	37.21	37.64	21.18	25.56	23.91	29.50	21.26	12.99	7.00	20.22	
ぶどう-1	55.5	91.4	76.3	109.2	89.6	89.9	110.5	109.9	116.2	140.8	129.0	
ぶどう-2	51.8	70.3	61.7	101.7	84.2	81.7	93.5	83.1	85.7	69.5	104.9	
ぶどう-3	68.2	78.4	60.2	75.5	51.0	81.7	75.0	77.8	72.5	90.0	111.6	
Ave.	58.5	80.0	66.1	95.5	74.9	84.4	93.0	90.3	91.5	100.1	115.2	
SD	8.60	10.64	8.89	17.69	20.90	4.73	17.76	17.21	22.41	36.71	12.44	
CV(%)	14.70	13.30	13.46	18.53	27.89	5.61	19.09	19.06	24.50	36.67	10.80	
りんご-1	55.6	64.8	46.1	69.8	61.4	52.2	72.8	66.6	67.9	75.8	65.8	
りんご-2	34.5	57.4	53.0	59.5	39.3	33.1	59.0	54.4	64.1	58.7	77.9	
りんご-3	45.0	54.8	55.0	67.6	49.5	50.3	81.8	64.5	71.7	95.9	79.5	
Ave.	45.0	59.0	51.4	65.6	50.1	45.2	71.2	61.8	67.9	76.8	74.4	
SD	10.55	5.19	4.67	5.42	11.06	10.52	11.48	6.52	3.80	18.62	7.49	
CV(%)	23.43	8.79	9.09	8.26	22.09	23.28	16.13	10.55	5.60	24.24	10.07	

表 5. 連続注入に伴う保持時間の変動

N-Methyl/Carbamate												
	oxamyl	methomyl	thiodicarb	MTMC	bendiocarb	PHC	NAC	MPMC XMC	MIPC	pirimicarb	BPMC	methiocarb
m/z	242.3	163.2	355.5	166.2	224.2	210.2	202.2	180.2	194.2	239.3	208.3	226.3
St.-1	7.27	7.62	8.64	8.99	9.55	9.65	9.72	10.28	11.02	10.99	12.70	/
Samp.-1	6.99	7.48	8.92	9.13	9.48	9.55	9.72	10.18	11.05	10.81	13.09	13.61
2	7.24	7.45	8.78	9.03	9.66	9.62	10.29	10.01	11.16	10.99	12.95	13.75
3	7.17	7.34	8.78	9.06	9.73	9.73	10.25	10.25	10.99	10.99	12.98	12.81
4	7.20	7.59	8.57	9.16	9.48	9.51	10.21	10.04	11.02	11.16	13.05	12.64
5	7.27	7.38	8.71	9.13	9.66	9.48	10.22	10.04	11.20	10.88	13.09	12.15
6	7.07	7.59	8.78	9.24	9.45	9.52	9.73	9.83	10.67	10.88	12.81	12.67
7	7.45	7.52	8.78	9.03	9.34	9.69	10.01	10.25	11.23	11.30	13.12	12.84
8	7.27	7.52	8.82	9.06	9.52	9.27	10.01	10.25	10.95	11.44	13.12	12.73
9	7.34	7.38	8.53	9.20	9.02	9.72	9.83	10.21	10.99	11.26	12.80	12.74
St.-2	7.20	7.45	8.81	8.95	9.20	9.45	10.11	10.15	11.23	11.41	13.16	12.56
Ave.	7.22	7.48	8.74	9.09	9.46	9.56	10.01	10.14	11.05	11.10	12.99	12.85
SD	0.12	0.09	0.12	0.09	0.21	0.14	0.23	0.14	0.16	0.22	0.16	0.48
CV(%)	1.72	1.26	1.32	0.99	2.22	1.44	2.25	1.38	1.47	2.01	1.19	3.73

Other Pesticides											
	chlorsul- furon	metsulfu- ron methyl	azimsulfu- ron	ethoxysul- furon	imazasu- furon	pyrazosu- furon ethyl	flazasu- furon	tribenuro- methyl	bensulfu- ron methyl	cyclosulfa- muron	daimuron
m/z	358.8	381.4	425.4	399.4	413.8	415.4	408.3	396.4	411.4	422.4	269.4
St.-1	5.21	5.28	5.24	5.59	5.38	5.49	5.38	5.73	6.12	6.29	/
Samp.-1	5.91	6.09	6.22	6.36	6.54	6.57	6.68	7.45	8.85	9.55	15.36
2	5.87	6.08	6.22	6.33	6.57	6.57	6.68	7.38	8.71	9.34	15.36
3	5.87	5.98	6.22	6.29	6.54	6.57	6.64	7.31	8.68	9.20	14.18
4	5.63	5.73	5.91	6.08	6.22	6.26	6.54	7.13	8.18	8.50	13.73
5	5.66	5.70	5.91	6.05	6.22	6.26	6.51	7.21	8.15	8.57	13.20
6	5.70	5.84	5.98	6.12	6.36	6.36	6.54	7.24	8.29	8.61	13.09
7	5.98	6.08	6.36	6.54	6.54	6.54	6.64	7.41	8.71	9.65	13.36
8	6.54	6.61	6.79	7.20	7.31	7.31	7.55	9.03	9.55	11.65	14.10
9	6.93	7.03	7.31	8.29	8.61	8.61	8.57	9.94	10.11	12.99	14.00
St.-2	6.54	6.61	6.78	7.34	7.62	7.59	7.80	6.40	9.83	11.96	13.50
Ave.	5.99	6.09	6.27	6.56	6.72	6.74	6.87	7.48	8.65	9.66	13.99
SD	0.50	0.49	0.55	0.76	0.85	0.83	0.83	1.14	1.07	1.89	0.81
CV(%)	8.28	8.10	8.79	11.61	12.69	12.27	12.15	15.24	12.33	19.54	5.81

表 6. 標準品のLC/MSクロマトグラムにおける保持時間の変動

N-Methyl Carbamate												
	oxamyl	methomyl	thiodicarb	MTMC	bendiocarb	PHC	NAC	MPMC XMC	MIPC	pirimicarb	BPMC	methiocarb
m/z	242.3	163.2	355.5	166.2	224.2	210.2	202.2	180.2	194.2	239.3	208.3	226.3
St.-1	6.92	7.52	8.81	9.34	9.41	9.76	9.90	10.25	10.91	10.88	13.15	12.63
2	6.54	7.31	8.81	8.99	9.58	9.48	9.79	10.18	10.71	10.78	12.56	12.52
3	6.54	7.52	8.81	9.37	9.55	9.62	9.83	9.90	11.12	11.09	12.38	13.12
4	7.10	7.42	8.64	9.06	9.38	9.41	9.69	10.04	10.67	10.99	12.74	12.59
5	7.28	7.49	8.68	8.96	9.17	9.49	9.73	10.19	11.13	10.82	12.71	12.46
6	7.18	7.53	8.61	9.56	9.56	9.52	9.66	10.33	10.75	10.85	13.13	12.63
7	6.57	7.45	8.81	8.92	9.37	9.72	10.00	10.18	10.70	11.13	12.60	—
8	6.57	7.41	8.53	8.92	9.62	9.72	9.97	10.00	10.70	10.91	12.88	12.63
9	7.10	7.48	8.64	8.95	9.30	9.44	10.14	9.83	10.81	10.91	12.95	—
Ave.	6.87	7.46	8.70	9.12	9.44	9.57	9.86	10.10	10.83	10.93	12.79	12.79
SD	0.31	0.07	0.11	0.24	0.15	0.13	0.16	0.17	0.18	0.12	0.26	0.26
CV(%)	4.52	0.95	1.24	2.63	1.59	1.40	1.62	1.65	1.67	1.09	2.04	2.04

Other Pesticides											
	chlorsul- furon	metsulfu- ron methyl	azimsulfu- ron	ethoxysul- furon	imazasul- furon	pyrazosul- furon ethyl	flazasul- furon	tribenuron methyl	bensulfu- ron methyl	cyclosulfa- muron	daimuron
m/z	358.8	382.4	425.4	399.4	413.8	415.4	408.3	396.4	411.4	422.4	269.4
St.-1	5.24	5.59	5.42	5.66	6.22	6.29	6.54	5.84	7.52	8.25	13.92
2	5.24	5.49	5.73	5.80	5.84	6.05	6.57	—	7.80	8.36	13.71
3	5.17	5.28	5.63	5.73	6.19	6.08	6.50	5.63	7.83	8.25	14.00
4	5.35	5.56	5.66	5.84	6.36	6.36	6.54	—	7.69	8.32	13.68
5	5.39	5.63	5.60	5.63	6.19	6.19	6.61	5.81	7.59	8.50	14.11
6	5.31	5.31	5.59	5.70	5.87	5.91	6.54	5.59	7.66	8.01	14.00
7	5.28	5.38	5.49	5.84	5.98	6.26	6.54	5.73	7.97	8.39	13.89
8	5.24	5.56	5.60	5.81	6.02	6.16	6.54	5.77	7.66	8.40	14.03
9	5.31	5.53	5.56	5.70	6.26	6.19	6.51	5.84	7.45	8.40	14.07
Ave.	5.28	5.48	5.59	5.75	6.10	6.17	6.54	5.74	7.69	8.32	13.93
SD	0.07	0.13	0.09	0.08	0.18	0.14	0.03	0.10	0.16	0.14	0.15
CV(%)	1.26	2.32	1.63	1.38	2.98	2.22	0.49	1.75	2.10	1.69	1.09

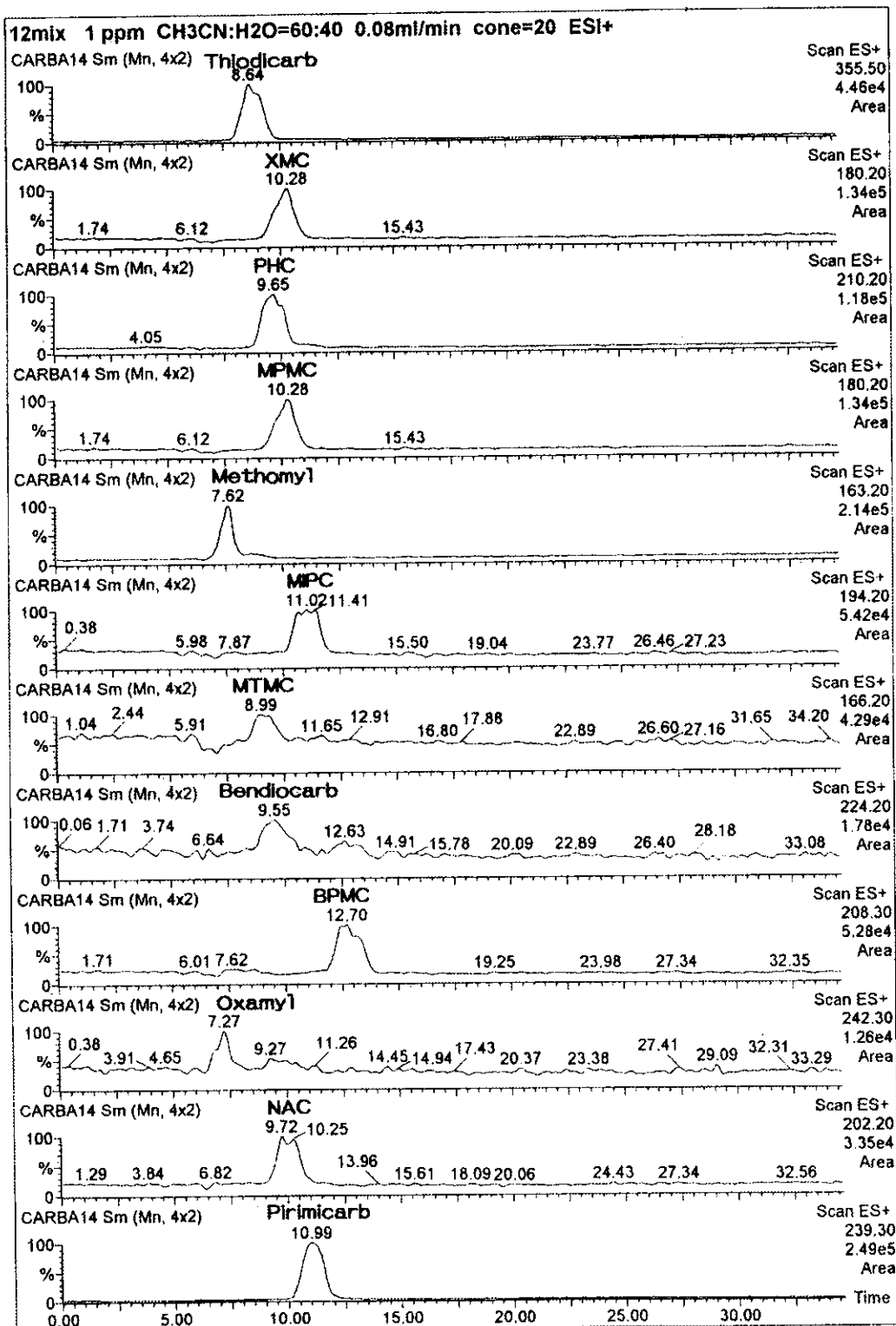


図 1. N-メチルカルバメート系農薬のLC/MSクロマトグラム

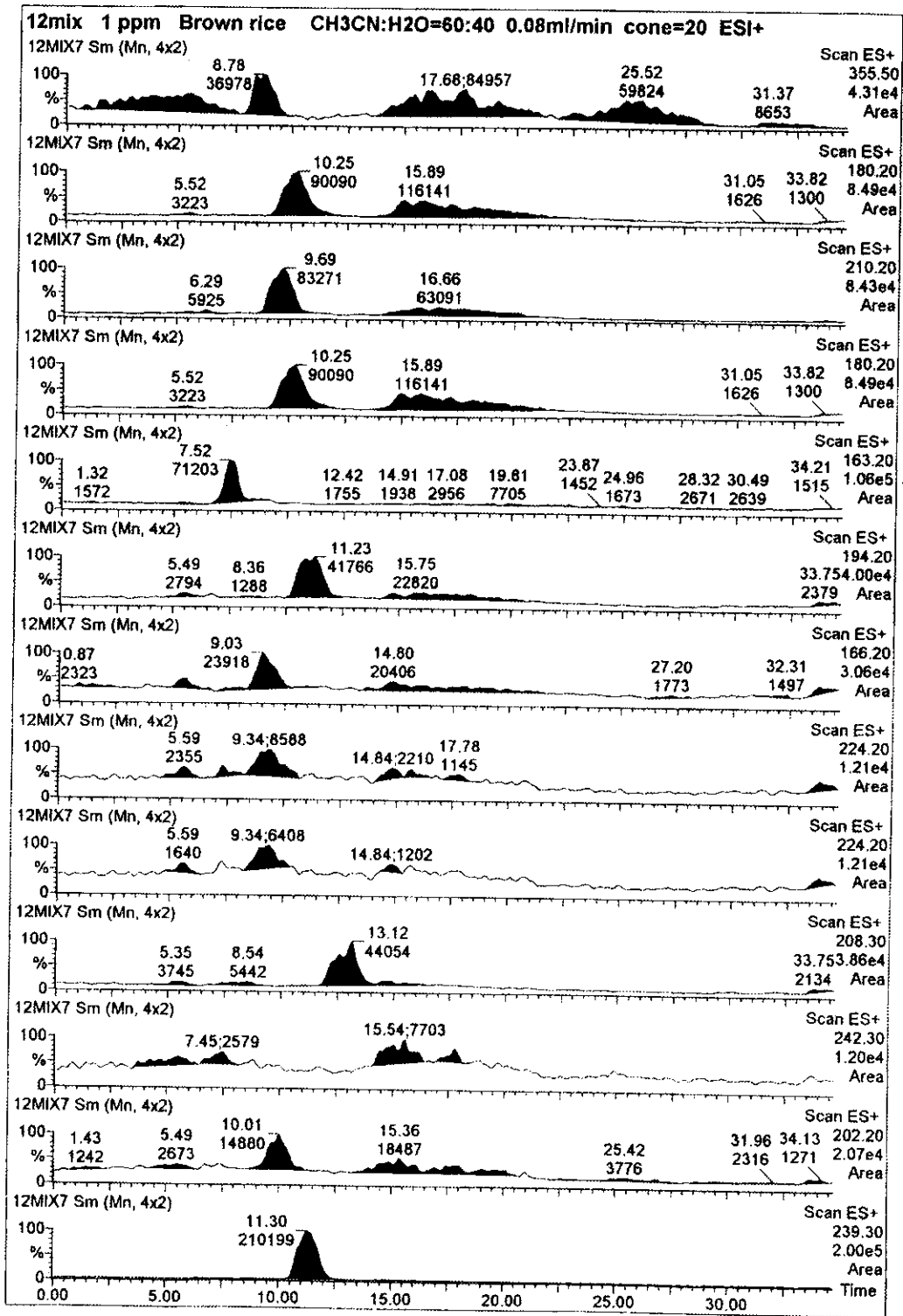


図 2. LC/MSによる玄米中N-メチルカーバメイト系農薬の検出

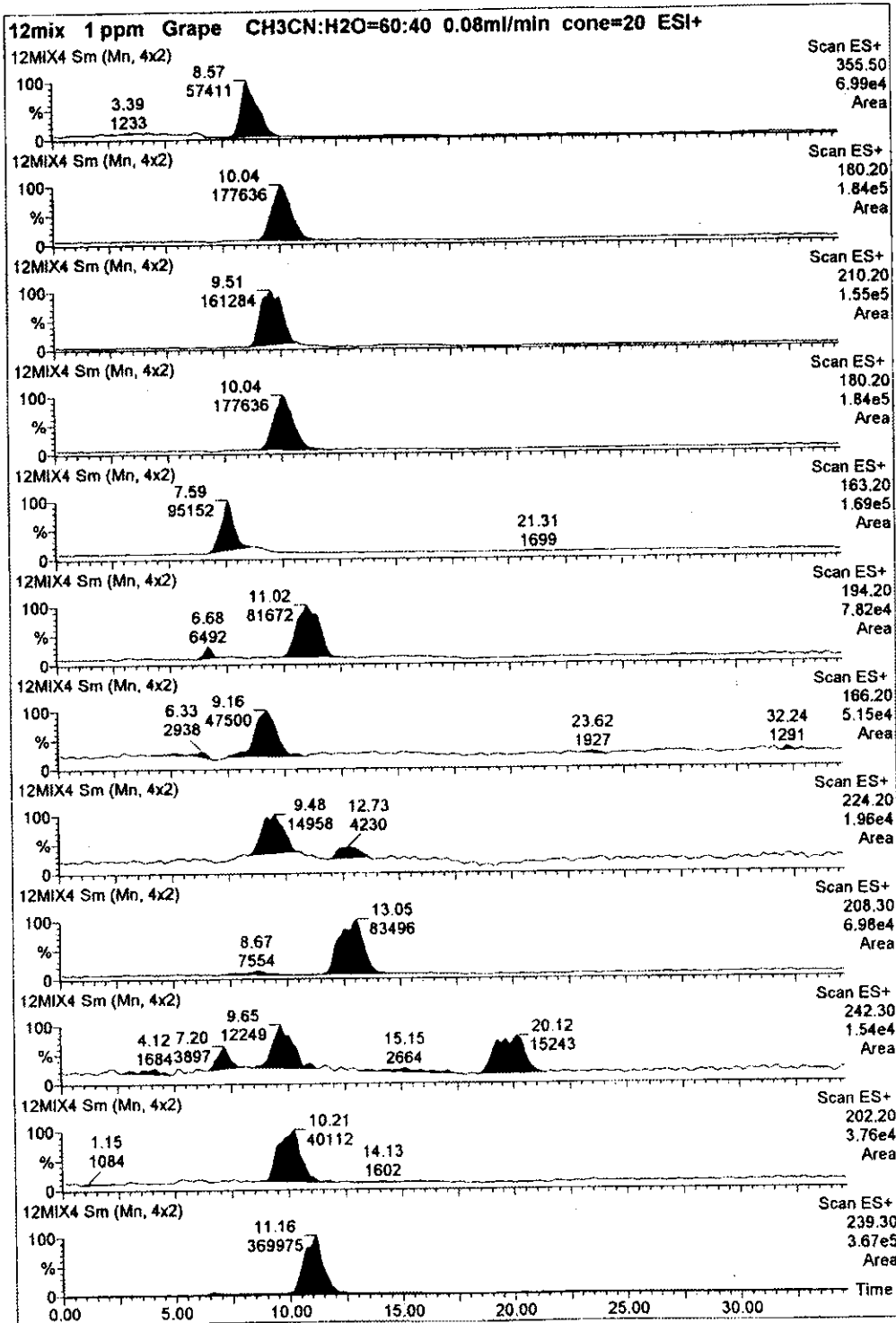


図 3. LC/MSによるぶどう中 N-メチルカルバメート系農薬の検出

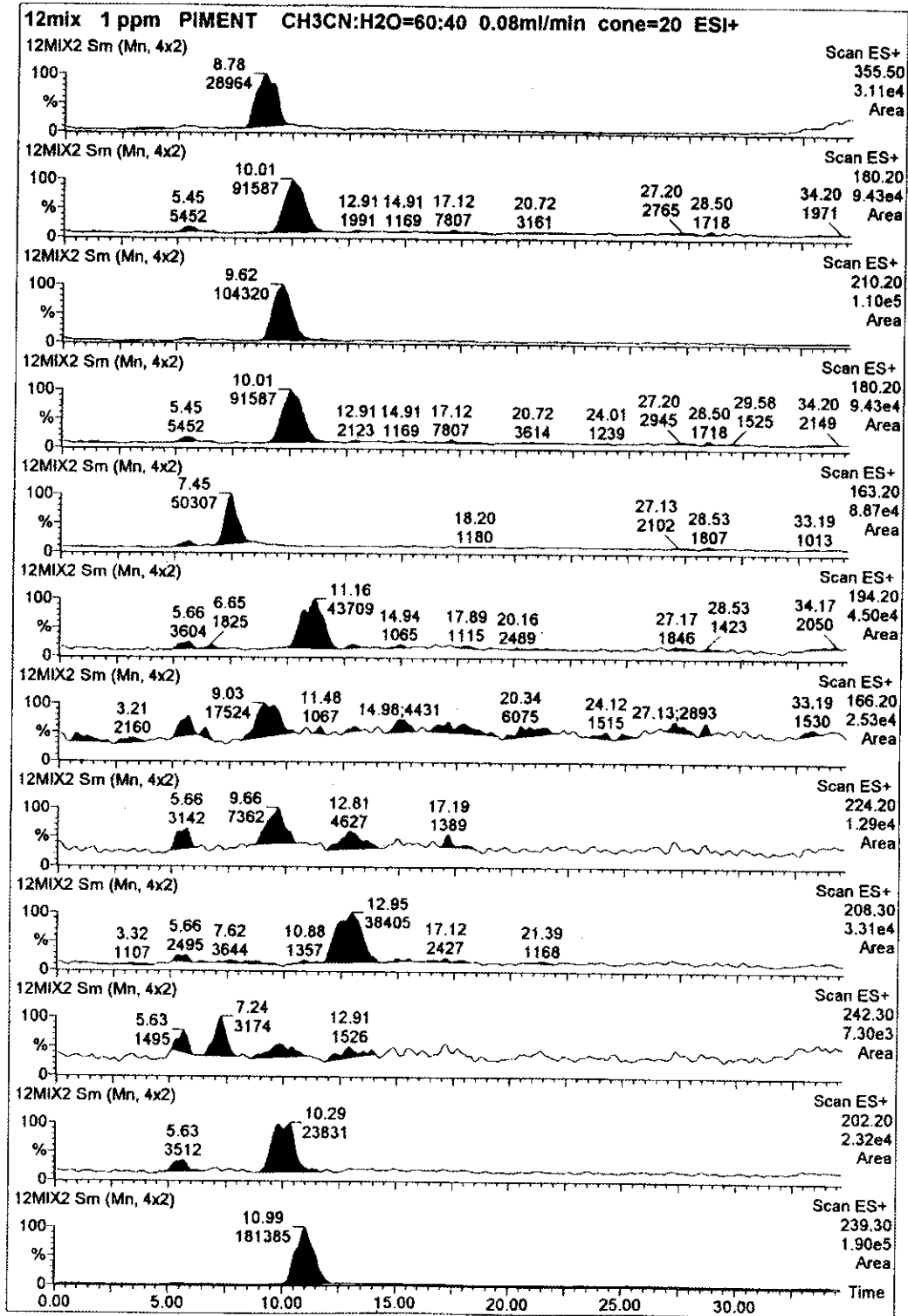


図 4. LC/MSによるピーマン中 N-メチルカルバメート系農薬の検出

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) ピレスロイド系殺虫剤ペルメトリンの

ELISA 開発に関する研究

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

農薬免疫アッセイと機器分析の比較評価に関する研究
(1)ピレスロイド系殺虫剤ペルメトリンの ELISA 開発に関する研究

分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学教授

研究要旨

現在、合成ピレスロイド系殺虫剤が広く用いられており、人体に対する毒性は低いとされているが、その残留が懸念され、迅速にモニタリングすることが要求されている。従来より合成ピレスロイド系殺虫剤の分析法には、HPLC、GC/ECD、GC/MSなどの機器分析法が用いられているが、煩雑な試料の前処理、操作に熟練を要するなど問題があり、多検体の分析には適していない。そこで、高いサンプル処理能力と特異性を有する Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法を用い、合成ピレスロイド系殺虫剤ペルメトリンの分析法の開発を行った。免疫抗原にはペルメトリンハプテンに種々のタンパク質をコンジュゲートさせたものを用いた。この抗原をウサギに約3ヶ月間免疫し、得られたポリクロナール抗体を実験に供した。8種類のコーティング抗原をスクリーニングし、低いバックグラウンドと最も感度の高い組み合わせを最適条件とした。その結果、IC₅₀は約30ppbとなり、高感度な測定が可能となった。また、ペルメトリンは、脂溶性化合物のためメタノールの抗体に対する影響を検討し、その濃度を40%まで用いることができた。更にDMSOの濃度も20%まで使用可能であった。合成ピレスロイド系殺虫剤は構造がお互いに非常に類似しているため、交差反応性を調べた。その結果、タイプIピレスロイド系殺虫剤であるフェントリンは、交差反応性がペルメトリンと同等である一方、シアノ基を有するタイプIIピレスロイド系殺虫剤では、ほとんど交差反応性は示さなかった。このことより本アッセイによりタイプIとIIのタイプ別測定が可能となった。

研究協力者

渡辺卓穂 星薬科大学

Bruce D. Hammock University of California,
Davis

剤として、よく用いられており、農業での使用の他、その適用は昆虫病のベクターのコントロールや繊維産業における蛾の防虫としても使われている[2, 3]。これらの使用により、農業由来の食料や生態系への汚染が懸念される。ペルメトリンは、ほ乳類に対する毒性は一般に低いと考えられている一方で、Barruecoらは強い毒性を報告している[4]。

A. 研究目的

殺虫剤の中で合成ピレスロイドは広く用いられており、それらは毒性、光安定性、化学構造が広く異なっている[1]。アレスリン、ピオアレスリンのような初期のピレトリン系殺虫剤は空気、水に不安定であり、農業での使用が限定されていた品質であった。しかし、近年開発されたピレスロイド系殺虫剤は、より空気、光に安定であり、現在の農業に広く用いられている。

現在、ピレスロイドの分析法には、HPLC[5]、GC/ECD[5]、GC/MS[6,7]等の機器分析法が用いられている。これらの方法は感度が良好であるが、操作に熟練を必要とし、試料の前処理が煩雑であるという欠点がある。その一方で、多検体の残留農薬を効率良く測定する必要性があり、分析するサンプルの増加に応じるために、迅速で実際的な方法を開発する目的で、HammockとMummaは、免疫

その中でペルメトリンは、合成ピレスロイド系殺虫

アッセイが農薬の残留を検出するのに用いることができることを提唱した[8]。その後、免疫アッセイがサンプルの迅速スクリーニングに応用できることが示された。

ELISA のような免疫アッセイ法は機器分析法に比較して、低コストで高いサンプル処理能力をもっているため、機器分析法に替わるか、あるいは機器分析に要求されている多検体の分析を減らすための初期の迅速スクリーニング操作としての能力を有している。ELISA 法は特異性のある分析法であることから、動物あるいは植物組織、沈澱物や土壌のようなマトリックス中に残留している農薬の定量が容易になり、有害な有機溶媒を減らすことも可能である[9]。

このような背景の中で、ペルメトリンに関して、Stanker らは、ペルメトリン類似化合物である phenoxybenzyl cyclopropane dicarboxylate を含む免疫原に対するモノクローナル抗体を作製し、肉抽出物中のペルメトリンを検出するため ELISA を報告した[10]。また、Skerritt らも同じ抗体で穀類及び食用油抽出物の両方からペルメトリンを検出するための ELISA format を作成した[11]。しかし、これらの抗体もタイプ I とタイプ II ピレスロイドを区別すべき特徴であるシアノ基に対する特異性に乏しい。また、ペルメトリンは、脂溶性であり、メタノール等の有機溶媒を使用する必要があるが、いずれの抗体もその使用が制限されることより、実試料への適用が難しい。そこで、タイプ I ピレスロイドであるフェノトリンにも適用でき、シアノ基に対する特異性の高いポリクローナル抗体を作製し、タイプ I、タイプ II ピレスロイドを区別できる ELISA format の開発を行った。

B. 研究方法

1. 試薬

ペルメトリン標準品は、Reidel de Haën 社 (Seelze, Germany) より購入し、ペルメトリンハプテンは、Fig. 1 に示すものを合成して用いた。他の合成ピレスロイド系殺虫剤の標準品、エスフェンバレート、デルタメトリン、シペルメトリン、シフルトリン、フ

ェノトリン、レスメトリン、フルバリネートは、いずれも Reidel de Haën 社製を用いた。メタノールは、Fisher Scientific 社製 GC Resolv グレードを、ジメチルスルホキシド(DMSO、99.8%)は、アルドリッチ社製を用いた。コンジュゲートの作製には 1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDC) (アルドリッチ)、*N*-ヒドロキシルホコハク酸イミドナトリウム塩(Sulfo-NHS) (Fluka)、*N,N*-ジメチルホルムアミド(DMF、アルドリッチ)をそれぞれ使用した。キャリアタンパク質としてチログロブリン(THY)、ウシ血清アルブミン(BSA)、オボアルブミン(OVA)は、いずれもシグマ社製を用いた。

2. 装置

ELISA には、Nunc 社製(Roskilde, Denmark) 96-well マイクロタイタープレイトを用い、吸光度は、Molecular Devices 社製(Menlo Park, CA) Vmax マイクロプレートリーダーで 2 波長モード(450-650 nm)で測定した。ハプテン-プロテインコンジュゲートのキャラクタリゼーションは、島津社製 UV-2101PC UV-VIS Scanning spectrophotometer を用い算出した。

3. ハプテン-キャリアタンパク質コンジュゲートの作製

低分子化合物はそのまま哺乳動物に免疫しても抗体が得られない。そこで、低分子化合物に免疫原性をもたせるために、ハプテンをキャリアタンパク質と共有結合した複合体を作製した。Fig. 2 に活性エステル法による複合体の合成法の原理を示す。本法は、ハプテンのカルボキシル基と Sulfo-NHS の反応により、相当する活性エステルを得て、これとキャリアタンパク質のアミノ基とのアミド結合により、ハプテン-タンパク質複合体を得る。この方法はやや温和であり、ハプテンと酵素などの結合に適している。Fig. 2 にペルメトリンハプテン-タンパク質複合体合成の操作法を示す。40 mM ペルメトリンハプテン、50 mM EDC 及び 60 mM Sulfo-NHS ナトリウム塩を 3 mL の無水 DMF に窒素気流下で一昼夜、室温で攪拌しながら溶解させ

る。予め、25 mg BSA、OVA、THYをそれぞれ PBS 6 mLに4℃で溶解させ、先のDMF溶液1 mLをそれぞれのタンパク質溶液に攪拌させながら滴下させ、4℃、30分間攪拌し、更に室温で一昼夜攪拌し反応させる。反応生成物は、PBSに対して透析を行い、未反応物質を除去した。

4. 免疫

ペルメトリンハプテン-BSA、OVA、THY複合体をそれぞれ免疫原としてニュージーランド白色ウサギ2羽ずつに免疫した。すなわち、0.5 mg/0.5 mL抗原に等量の Freund's 完全アジュバントを加え、ウサギの背に皮下注を行った。最初の免疫1ヶ月後に2回目の免疫を行い、3週間の間隔で追加免疫し、免疫後10日で各々採血し、抗体力価をスクリーニングした。

5. ELISA

Shanらの方法に従って行った[12]。0.1 M炭酸塩-重炭酸塩緩衝液(pH 9.6)に溶解させた種々のコーティング抗原を96-wellマイクロプレートに100 mL/well、4℃で一昼夜コーティングした。コーティングしたプレートは、PBST (PBS + Tween 20; 8 g/L塩化ナトリウム、1.15 g/Lリン酸水素二ナトリウム、0.2 g/Lリン酸二水素カリウム、0.2 g/L塩酸カリウム、0.05%(v/v) Tween 20)で洗浄し、PBSに溶解させた0.5%(w/v) BSAで200 mL/well、室温で30分間、ブロッキングした。PBSTで洗浄後、0.2%(w/v) BSAを含むPBS溶液で希釈した抗血清50 mL/wellと50 mL/wellインヒビター溶液を加え、室温で1時間、競合させた。次にPBSTで洗浄後、ヤギ抗ウサギIgG抗体にペルオキシダーゼを標識した2次抗体(PBSTで3000倍希釈、100 mL/well)を加え、室温で1時間、インキュベーションした。更にPBSTで洗浄後、テトラメチルベンチジン(TMB)基質溶液(100 mL/well; 30%(v/v)過酸化水素3.3 mL、0.6%(w/v) TMB/DMSO 400 mLを25 mLの酢酸緩衝液(pH 5.5)に溶解)を加え発色させた。発色は、50 mL/wellの2 M硫酸を加えることで停止させ、吸光度の測定は450 nmで行った。標準曲

線は、分析対象物質の濃度の対数と吸光度でプロットし、four-parameter対数式に従った($y = ((A-D)/[(1+x/C)^B]+D)$)。すなわち、Aは最大吸光度、Bは変曲点での傾き、Cは50%阻害する分析対象物の濃度を、また、Dは最小吸光度を示す。

6. 交差反応性

以下に示す計算式より算出した。

$$CR\% = (\text{ペルメトリンの } IC_{50} / \text{試験化合物の } IC_{50}) \times 100$$

7. アッセイの最適化

溶媒の影響を検討するために、0、10、20、40、60、80、100%(v/v)メタノール、DMSOを含むPBS緩衝液でペルメトリン標準溶液を調製した。

C. 結果及び考察

1. 抗血清のスクリーニング

8種類のコーティング抗原を合成し、検討を行った。用いた抗血清は、最も抗体力価が大きいと考えられるTHY複合体で免疫して得られたものを用いた。いずれのコーティング抗原にもBSA複合体を用いた。抗体価も同一免疫原でもウサギの違いで変化する。Fig. 3に示すようにphenoxybenzoic acidを基本骨格として持つPBA-BSA、1-90E-BSA、1-85B-BSAは、抗体価が高く、1-85B-BSAが最も良好な IC_{50} を示したことより、コーティング抗原として1-85B-BSAを用いることとした。更にコーティング抗原、抗血清の希釈倍率、2次抗体濃度を検討した結果、Table 1に示すようにコーティング抗原(1-85B-BSA)は、1/50,000を、抗血清(#298ウサギより得た)は、1/8,000の希釈倍率で最も良好な IC_{50} が認められた。以上の条件を用い、アッセイの最適化を行った。

2. アッセイの最適化

ペルメトリンは、脂溶性物質であり、アッセイには有機溶媒、界面活性剤の使用が不可欠となる。しかし、一般に有機溶媒等を用いることで抗血清の感度や特異性に影響を与えることが知られている。そ

ここでメタノールの影響を検討し、その結果を Table 2 に、DMSO の影響を Table 3 にそれぞれ示す。メタノール濃度は、有意に感度と吸光度に影響を与えることがわかった。最大吸光度は、メタノール濃度の増加で増強されるが、Table 3 に示すように DMSO では有意に吸光度を減少させた。これは、抗体とハプテンの結合を阻害していることが考えられるが、感度は良好であり、メタノール、DMSO 共に用いることができることが分かった。最適メタノール濃度は、標準曲線から得られる最大吸光度と最小吸光度の比(A/D)に基づいて選択した。ペルメトリンは、先に述べたように脂溶性が強いことから、用いるガラス容器やプラスチック容器への吸着が懸念される。そこでメタノール及び DMSO 濃度は、それぞれ 40%、20%を用いることとした。しかし、DMSO は、メタノールに比べ発色が短時間で行えることから、20% DMSO を最適条件に設定した。その結果、IC₅₀ は、32.7 mg/L となった。Fig. 4 に最適条件での標準曲線を示す。検出限界は、コントロールの吸光度から 3σ を引いた値から算出した結果、1.3 mg/L となった。

3. 交差反応性

合成ピレスロイド系殺虫剤は Table 4 に示すように非常に類似した構造を持つものが多い。そこで特に類似構造を有するフェントリン、レスメトリン、シペルメトリン、シフルトリン、エスフェンバレレート、デルタメトリン、フルバリネートとの交差反応性を検討した。Table 4 に示すように、フェントリンとの交差反応性は 78% と非常に高いことが分かった。これはペルメトリンとフェントリンの構造が塩素の違いのみであることから同等の反応性が認められたと考えられる。一方、シペルメトリンは、シアノ基の違いだけはあるが、ほとんど交差反応性を示さなかった。この結果より、本抗体は、シアノ基を強く認識することが考えられ、シアノ基を有さない、すなわち、タイプ I ピレスロイド系殺虫剤であるペルメトリン、フェントリンを認識し、シアノ基を有するタイプ II ピレスロイド系殺虫剤を認識しないことが分かった。これは、先に発表されている論文と比較すると、このように強くシア

ノ基を認識する抗体は得られていない。このことから、本抗体を用いることで、合成ピレスロイド系殺虫剤のタイプ I と II を区別して測定することが可能となった。

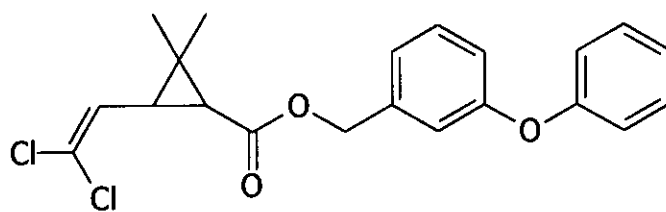
D. 結論

本研究では、合成ピレスロイド系殺虫剤ペルメトリンの ELISA 分析法の開発を主眼に研究を行ったが、結論的には得られた抗体がシアノ基を強く認識することが明らかとなった。その結果、本抗体を用いることで、構造が類似であるタイプ I、タイプ II ピレスロイド系殺虫剤のタイプ別一斉分析の可能性が見い出された。

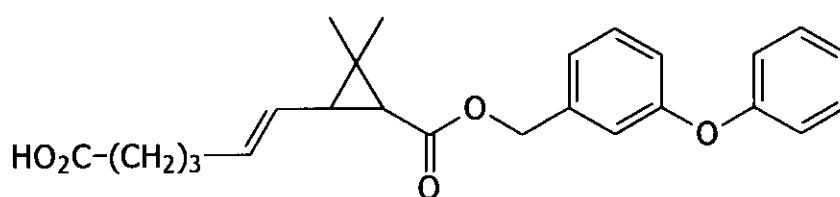
【参考文献】

1. Matsumura, F. ,*Toxicology of Insecticides*, 2nd ed.; Plenum Press: New York, 1985.
2. Zabel, T. F., Seager, J. and Oakley, S. D. (1988) Proposed environmental quality standards for list II substances in water: mothproofing agents, Water Research Centre Technical Report 201, WRC, Marlow, Buckinghamshire, UK.
3. Lindsay, S. W., Alonso, P. L., Schhellenberg, J. R. M. A., Hemingway, J., Adiamah, J. H., Shenton, F. C., Jawara, M. and Greenwood, B. M. (1993) A malaria control trial using insecticide treated beated bendnets and targetted chemoprophylaxis in a rural area of the Gambia, West Africa. 7. Impact of permethrin impregnated bed nets on malaria vectors. *Transactions of the Royal Society of Medicine and Hygiene*, **87**, 45-51.
4. Barrueco, C., Caballo, C., Herrera, A., Fernandez, R., Lopez, A., Diaz, M., Muro, J. and Dalapena, E. (1993) Studies on chromosomal aberrations and induction of micronuclei in underground workers exposed to permethrin, *Mutation Research*, **291**, 289-290.
5. Bottomley, P., Baker, P. G. (1984) Multi-residue determination of organochlorine, organophosphorus and synthetic pyrethroid pesticides in grain by

- gas-liquid and high-performance liquid chromatography, *Analyst*, **85**, 90.
6. Roberts, T. R. (1985) Current trends in pesticide residue analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, **4**, 3-7.
 7. Fleet, I. A., Tetler, L. W. and Monaghan, J. J. (1993) Study of the major fragmentation pathways of cypermethrin and related synthetic insecticides using tandem mass spectrometry. *Organic Mass Spectrometry*, **28**, 626-634.
 8. Hammock, B. D., Mumma, R. O. (1980) Potential of immunochemical technology for pesticide analysis. In *Pesticide Analytical Methodology*; Harvey, J., Zweig, G., Eds.; ACS Symposium
 9. Series 136; American Chemical Society: Washington, DC, pp321-352.
 9. Dohrman, L. (1991) Immunoassays for rapid environmental contaminant monitoring, *American Laboratory*, **23**, 29-30
 10. Stanker, L. H., Bigbee, C., Van Emon, J., Watkins, B., Jensen, R. H., Morris, C. and Vanderlaan, M. (1989) An immunoassay for pyrethroids: Detection of permethrin in meat. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 834-839.
 11. Skerrett, J. H., Hill, A. S., McAdam, D. P. and Stanker, L. H. (1992) Analysis of the synthetic pyrethroids, permethrin and (R)-phenothrin, in grain using a monoclonal antibody-based test. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 1287-1292.
 12. Shan, G., Stoutamire, D. W., Wengatz, I., Gee, S. J. and Hammock, B. D. (1999) Development of an immunoassay for the pyrethroid insecticide esfenvalerate. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 2145-2155.



Permethrin ($C_{21}H_{22}O_3Cl_2$, MW 391.29)



Permethrin hapten ($C_{25}H_{28}O_5$, MW 408)

Fig. 1 Chemical structures of permethrin and its hapten

40 mM hapten + 50 μ M EDC + 60 μ M Hydroxysulfosuccinimide / 3 mL of dry DMF

Stir under N_2 overnight

Add dropwise to the stirred protein (BSA, OVA, or THY) solutions (each 1 mL)

Stir at 4°C for 30 min

Stir at room temperature overnight (8-10 hrs)

Dialyze exhaustively against PBS at 4°C

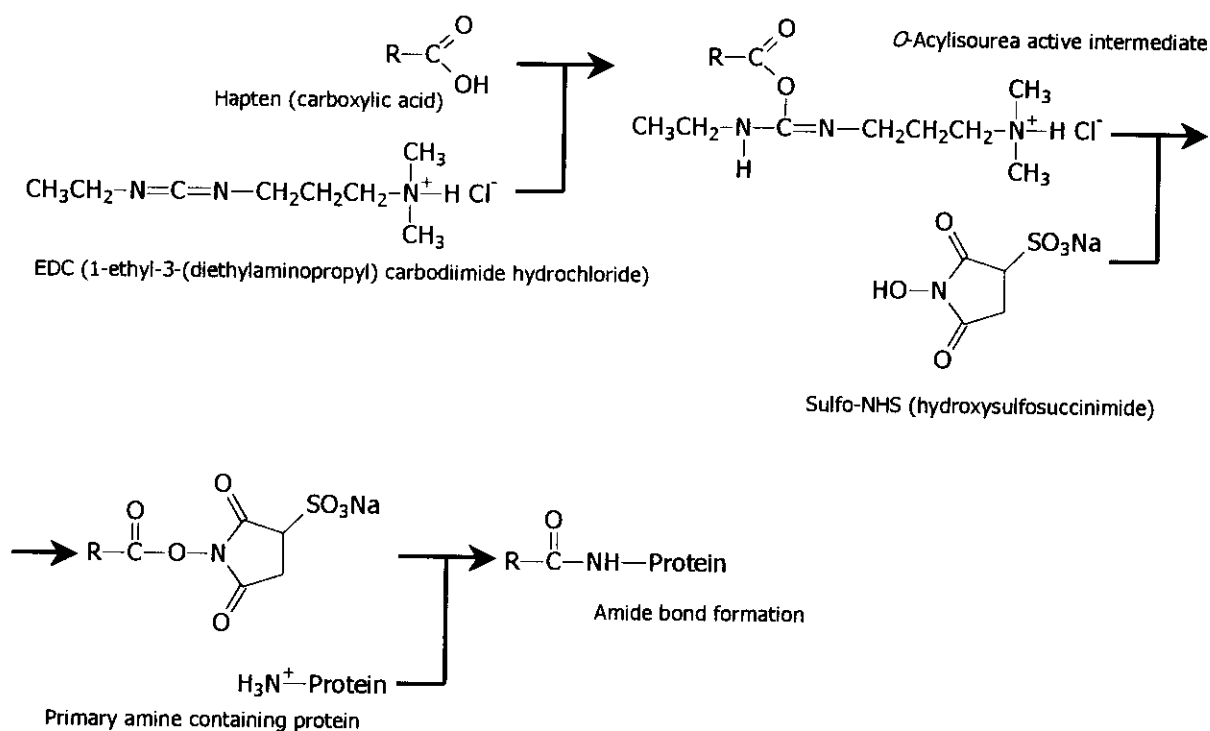


Fig. 2 Procedure for conjugate of permethrin hapten-BSA, OVA, or THY by active ester method

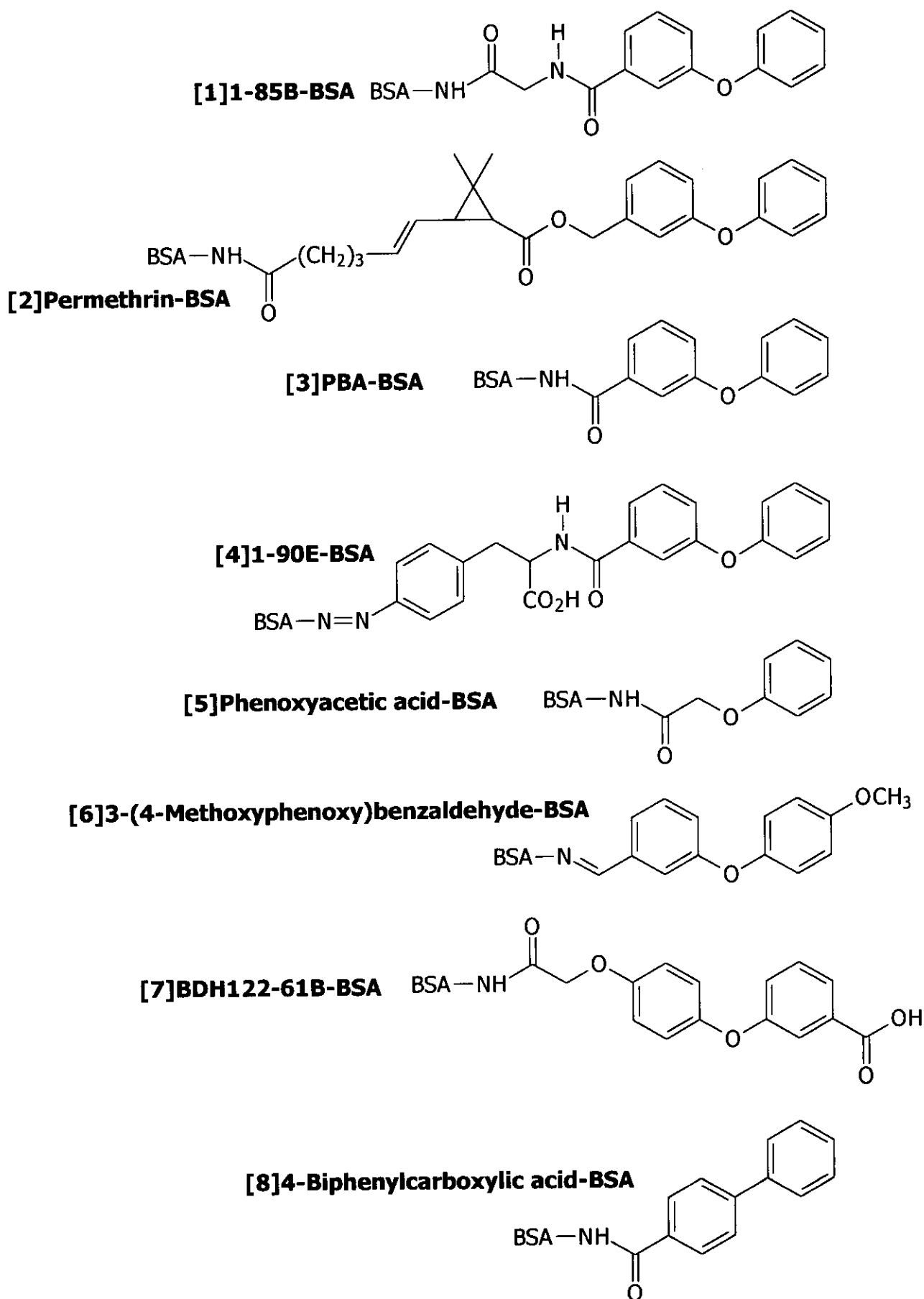


Fig. 3 Chemical structures of coating antigens

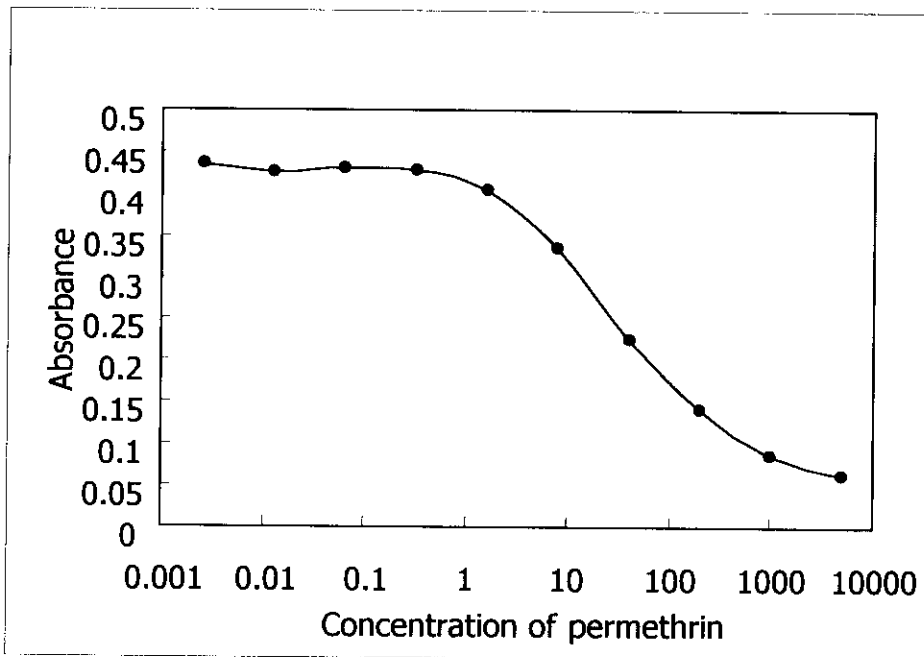


Fig. 4 Standard curve for permethrin