

Table 1 Indirect competitive ELISA protocol for permethrin

Coating:	Coating antigen (1-85B-BSA) diluted by 1/50,000 in carbonate buffer (pH 9.6), 100 μ L/well. Incubation at 4°C overnight.
Blocking:	0.5% BSA (5 mg/mL) in PBS, 200 μ L/well. Incubation at room temperature for 30 min. Washing 5 times.
Inhibition:	Standard permethrin prepared in methanoric PBS (containing 40% methanol or 20% DMSO). Serial concentration as follows; 125000, 25000, 5000, 1000, 200, 40, 8, 1.6, 0.32, 0.064 μ g/L, 50 μ L/well. #298 antibody diluted by 1/4,000 in PBS with 0.2% BSA, 50 μ L/well. Incubation at room temperature for 60 min. Washing 5 times.
2 nd antibody:	Goat anti-rabbit IgG-HRP diluted by 1/3,000 in PBST, 100 μ L/well. Incubation at room temperature for 60 min. Washing 5 times.
Substrate:	0.6% (w/v) TMB/DMSO 400 μ L + 30% (v/v) H ₂ O ₂ 3.3 μ L / 25 mL of acetate buffer (pH 5.5), 100 μ L/well. Incubation at room temperature for 15-20 min.
2M H ₂ SO ₄ :	50 μ L/well.
Reading:	Read microplate at 450-650 nm.

Table 2 Effect of methanol concentration

Methanol (%)	A _{max} (A)	Slope (B)	IC50 (µg/L) (C)	A _{min} (D)	A/D	r ²
0	0.36	0.78	60.5	0.08	4.5	1.00
10	0.31	0.78	77.1	0.08	3.9	0.99
20	0.23	0.84	58.9	0.01	23	1.00
40	0.14	0.96	51.4	0.01	14	1.00
60	0.20	0.78	65.9	0.13	1.5	0.99
80	0.46	0.39	1.33x10 ⁴	0.31	1.5	0.97
100	0.77	0.29	3.88x10 ⁹	-10.3	-0.1	0.97

ELISA conditions;

Coating antigen (1-85B-BSA): 1/50,000, Antiserum (#298): 1/8,000, 2nd antibody: 1/3,000

Four-parameter plot; $y = \{(A-D)/[(1+x/C)^B]\} + D$

A: Maximum absorbance at 450 nm

B: Slope

C: IC50 (µg/L)

D: Minimum absorbance at 450 nm

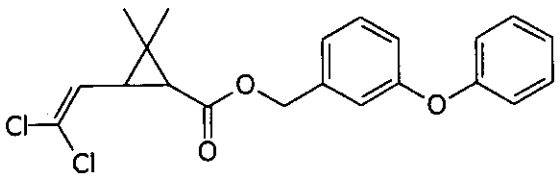
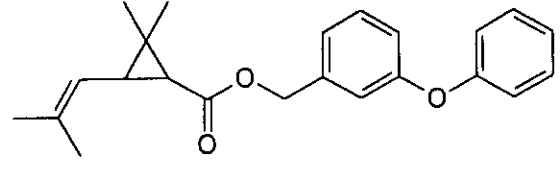
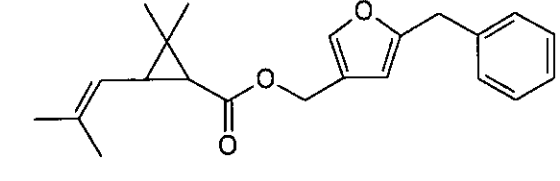
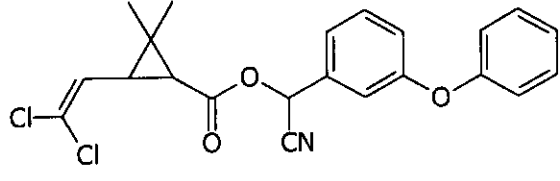
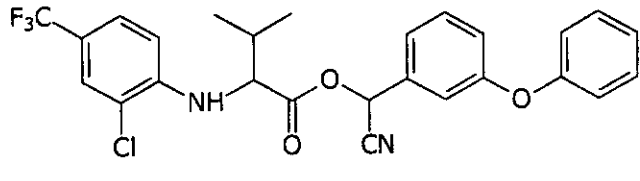
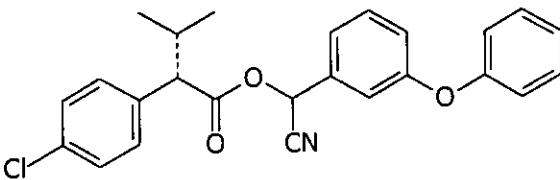
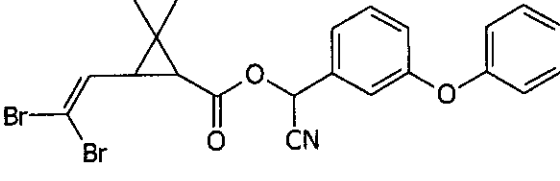
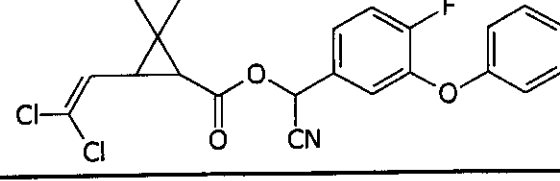
Table 3 Effect of DMSO concentration

DMSO (%)	A _{max} (A)	Slope (B)	IC50 (µg/L) (C)	A _{min} (D)	A/D	r ²
0	0.51	0.78	56.0	0.1	5.1	1.00
10	0.36	0.67	51.3	0.06	6.0	1.00
20	0.43	0.75	32.7	0.06	7.2	1.00
40	0.23	0.88	63.4	0.05	4.6	0.99

ELISA conditions;

Coating antigen (1-85B-BSA): 1/50,000, Antiserum (#298): 1/8,000, 2nd antibody: 1/3,000

Table 4 Cross-reactivities (CRs) of pyrethroids

Chemical structure	Analyte	CR(%)	IC50 (µg/L)
	Permethrin	100	50
	Phenothrin	78	64
	Resmethrin	1.2	4060
	Cypermethrin	0.7	7340
	Fluvalinate	0.2	2160
	Esfenvalerate	<0.01	616000
	Deltamethrin	<0.01	6480000
	Cyfluthrin	ni	

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) イムノアフィニティーカラムクリンナップ/HPLC による

柑橘類中イマザリルの分析

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)イムノアフィニティーカラムクリンナップ/HPLCによる柑橘類中イマザリルの分析

分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学 教授

研究要旨

イミダゾール系殺菌剤イマザリルに対するモノクローナル抗体(MoAb)を用い、イムノアフィニティークリンナップ(IAC)カラムを作製し、HPLC分析における試料前処理段階に本カラムを導入した。本カラムは、柑橘類試料中に残留するイマザリルを保持するために十分な保持容量を有し、更には、約30回程度の繰り返し利用が可能であった。また、本カラムの精製効果は、従来の前処理法に比べ、格段に優れており、前処理の簡便化、迅速化、更には、検体処理能力の向上も達成することが出来た。本カラムを用いた各種柑橘類試料からの添加回収試験の結果も良好であった。

研究協力者

湯浅洋二郎 (株)環境免疫技術研究所
渡辺栄喜 星薬科大学薬品分析化学教室

A. 研究目的

イマザリル〔1-(2-(2,4-dichlorophenyl)-2-propenyloxy)ethyl)-1H-imidazole〕は、真菌細胞壁の主成分であるエルゴステロール生合成を阻害することにより、効果を発揮する。本作用に基づき、主に柑橘類の保存中における腐敗防止の一翼を担うポストハーベスト農薬として、幅広く使用されている[1, 2]。我が国では、平成5年にレモン、オレンジ、グレープフルーツに対し、5 ppmの残留基準値が設定された[2]。従来、イマザリルは、HPLC/UVを用いた分析法を主とし、その他にGCを用いた分析法が数多く報告されている[3-5]。しかしながら、最近においては、機器分析法では、必要不可欠である分析前の試料調製を更に簡便化し、迅速化を図った方法が報告されている[6-8]。一方、免疫化学測定法は、操作の簡便性、分析対象物質に対する特異性、高い検体処理能力等、幾つかの利点を有している事から[9]、臨床診断薬への応用が早くから進められて来た[10]。近年においては、このような利

点を生かし、食品や環境中に残留する農薬のスクリーニング法として、海外を始め、我が国でも研究開発が盛んに行われるようになった[11-15]。本研究では、前述のような利点を有する免疫化学測定法の一つとして、イマザリルに対し、高い特異性を持つMoAbを用いたイムノアフィニティーカラムを作製した。本カラムを機器分析(HPLC/UV)法でのクリンナップ工程にIACカラムとして導入し、試料調製の迅速化、検体処理能力の向上、並びにクリーンアナリシスの達成を目的に研究を展開した。

B. 研究方法

1. 試料

イマザリル無添加レモン、オレンジ、グレープフルーツは、生協ユーコープから入手した。東京都内で市販されていたレモン、オレンジ(カリフォルニア産)、及びグレープフルーツ(フロリダ産)を用いた。

2. 試薬、装置

イマザリル標準品は、関東化学社製環境分析用標準品(純度:97%)を用いた。イマザリル標準原液は、イマザリル100 mgを精秤し、メタノール100 mLに溶解した(1 mg/mL)ものを用いた。

各種有機溶媒、及びその他の試薬類は、全て和光純薬社製特級試薬を用いた。

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 x 150 mm、粒径 4 mm)を、移動相には、メタノール-水(8:2)を流速 1.0 mL/min で送液した。検出波長を 230 nm に設定し、10 mL を注入して分析した。

3. 抗イマザリル MoAb の調製

抗イマザリル MoAb を含むマウス腹水は、渡辺らの方法で調製した[15]。得られたマウス腹水をプロテイン G カラム(ファルマシア社製)で精製した。

4. 免疫吸着体の調製

1 mM 塩酸で膨潤、洗浄した臭化シアン(CNBr)活性化アガロースゲル(ゲル平均粒径:90 nm)(ファルマシア社製)1 mL に抗イマザリル MoAb 2 mg を溶解した炭酸塩緩衝液(0.1 M、pH 8.3)を混ぜ、一晚、4 °C で緩やかに攪拌させながら、カップリングさせた。反応後、ゲルを炭酸塩緩衝液で洗浄し、未反応のゲル活性化基を Tris-塩酸緩衝液(0.1 M、pH 8.0)でブロッキング処理した。このゲルを Poly-Prep カラム(Bio-Rad 社製)にパッキングした。

5. 試料調製法

5-1. IAC カラム用試験溶液の調製法

破碎した各種柑橘類 5 g を採取し、これにメタノール 20 mL を加え、30 分間振とう抽出した。抽出後、吸引ろ過、更に、自然ろ過し、得られた抽出液をメタノールで 20 mL に定容した。抽出液を PBS(10 mM、pH 7.2)で 5 倍に希釈したものを PBS-メタノール(9:1) 1 mL で平衡化した IAC カラムに負荷した。希釈抽出液負荷後、カラムを PBS-メタノール(9:1) 5 mL、水-メタノール(9:1) 5 mL でそれぞれ洗浄後、PBS-メタノール(8:2) 2 mL、PBS-メタノール(6:4) 2 mL でイマザリルを溶出させた。更に、抽出液をアルカリ条件下、酢酸エチル 4 mL に転溶し、酢酸エチルを減圧除去した。得られた残留物をアセトニトリル 1 mL に溶解し、HPLC 分析に供し

た。

5-2. 従来分析法用試験溶液の調製法

破碎した各種柑橘類 20 g を採取し、これに 1 M 水酸化ナトリウム 5 mL 及び、アセトン 100 mL を加え、30 分間振とう抽出した。抽出後、吸引ろ過し、残渣にアセトン 50 mL を加え、先のろ液に合わせた。このろ液を減圧濃縮後、得られた濃縮液を Chem Elut ケイソウ土カートリッジ(パリアン社製)に負荷し、酢酸エチル 100 mL で溶出した。この溶出液を減圧濃縮後、硫酸転溶により、イマザリルを硫酸相に移し、得られた硫酸相を *n*-ヘキサンで洗浄した。硫酸相に 1 M 水酸化ナトリウム 10 mL を加え、酢酸エチル転溶により、イマザリルを酢酸エチル相に移し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、ろ過し、酢酸エチルを減圧除去した。残留物をアセトニトリル 2 mL に溶解し、HPLC 分析に供した。

6. IAC カラム保持容量(キャパシティー)の測定法

調製した IAC カラムのイマザリル保持容量は、Liらの方法に準じて実施した[16]。1 mg/mL イマザリル/PBS-メタノール(9:1)溶液を予め平衡化した IAC カラムに継続的に負荷し続け、1 mL ずつ溶出分画を採取し、各分画を HPLC でモニターした。溶出分画中のイマザリルの濃度と IAC カラムに負荷したイマザリル溶液の濃度が同じレベルに達した際に IAC カラム内は、イマザリルで飽和状態となり、これより、IAC カラムの保持容量を算出した。

C. 結果及び考察

1. IAC カラムの性能評価

上述の方法で調製したゲルへの抗イマザリル MoAb のカップリング効率は、約 90%(約 1.8 mg)であった。また、Liらの方法[16]に準じ、IAC カラムの保持容量を測定したところ、約 1.8 mg の抗イマザリル MoAb がカップリングしたゲル 1 mL に対し、約 2 mg のイマザリルを保持させる事が可能であった。

IAC カラムは、ある程度の繰り返し利用が可能であることが利点の一つとして挙げられる。本研究で

調製した IAC カラムの繰り返し利用回数を検証したところ、20 回の使用で始めの IAC カラム保持容量の 72.5%(1.45 mg)、30 回の使用で 60.5%(1.21 mg)、40 回の使用で 37.5%(0.75 mg)となり、徐々にイマザリル保持容量が減少した。また、同様に調製した IAC カラムにおいてもほぼ同様に保持容量が減少した。

2. イマザリルの溶出挙動

抗原-抗体複合体は、Van der Waals 力、水素結合、疎水結合等、種々の結合が関与し、結合を形成している。Katz らと van Ginkel は、これらの結合の切断方法と IAC カラムからの抗原の溶出方法に関して報告している[17, 18]。本研究では、IAC カラムからのイマザリルの溶出方法として、メタノールと PBS との間でグラジエントをかけ、IAC カラム内の極性を変化させることにより、イマザリルの溶出を図る方法を検討した。

予め平衡化した IAC カラムにイマザリル 10 mg を PBS-メタノール(9:1) 10 mL に溶解した溶液(1 mg/mL)を 1 mL 負荷し、イマザリルの IAC カラムからの溶出挙動を調べた。

イマザリル溶液を負荷後、IAC カラムを洗浄し、PBS-メタノール(8:2)、PBS-メタノール(6:4)、PBS-メタノール(4:6)、PBS-メタノール(2:8)、メタノールをそれぞれ 5 mL ずつ流し、各々を別々に分取した。更に、各分画を酢酸エチルに転溶し、酢酸エチルを減圧留去後、得られた残渣をアセトニトリル 1 mL に溶解したものを HPLC 分析に供した。その結果、IAC カラム内に保持されていたイマザリル(絶対量として 1 mg)は、PBS-メタノール(8:2)、PBS-メタノール(6:4)の 2 分画内にほぼ 100%に近い収率で溶出していることが分かった(Fig. 1)。また、IAC カラムの洗浄分画(PBS-メタノール(9:1)、水-メタノール(9:1))へのイマザリルの溶出も若干、認められた。しかし、この溶出量は、非常に少量であり、本カラムを実試料に応用しても回収率への影響は、殆ど無く、洗浄分画へのイマザリルの溶出は、無視しても差し支えが無いと考えられた。

渡辺らは、メタノール含量の増大に伴い、抗イマ

ザリル MoAb とイマザリルとの反応性に影響を及ぼすと報告している[15]。上述のように IAC カラムからの最適溶出溶媒には、最大 40%(v/v)のメタノールが含有されている。それ故、このメタノール含有量が IAC カラムの劣化の原因に繋がることが懸念された。しかし、C-1 で述べた通り、本カラムは、約 30 回の繰り返し利用が可能であり、比較的強いメタノール耐性を有しているものと考えられた。

一方、Katz らと van Ginkel が報告しているように[17, 18]、IAC カラム内の pH 条件も抗イマザリル MoAb とイマザリルとの間の反応性に影響力を及ぼすと考えられた。今回の検討では、レモン、オレンジ、及びグレープフルーツのような実試料へ本カラムを適応した際、PBS を用い、IAC カラム内の pH を約 7.0 に保持し、検討を実施した。Fig. 2 と Table 1 に示すようにこれら柑橘類に由来した夾雑物の妨害は、殆ど認められず、更には、各々の柑橘類からのイマザリルの回収率も非常に良好であった。従って、IAC カラム内の pH は、PBS を用いることにより約 7.0 に保持することが最適であると考えられた。

3. IAC カラムの精製効果

本研究で作成した IAC カラムの精製効果を従来の前処理法と比較し、その精製効果に関して、検討した。Fig. 2 に示したように IAC カラムを使用した場合、高い精製効果を示し、且つイマザリルのピーク(保持時間 6.1 分)付近に夾雑物に起因した妨害ピークも観察されなかった。一方、従来の前処理法においては、B-5-2 で述べたように Chem Elut ケイソウ土カートリッジ転溶、硫酸転溶、アルカリ条件下での酢酸エチル転溶、*n*-ヘキサン洗浄等、操作が多段階に渡り、煩雑さを伴う。更に、Fig. 2 のクロマトグラムからも精製効果は、明らかに不十分で、イマザリルのピーク付近には、柑橘類の夾雑物に起因した妨害ピークが多数、認められた。従って、本カラムを柑橘類試料の前処理に導入することにより、操作を省力化し、且つ高い精製効果を得ることが期待される。

4. 添加回収試験

確立した条件に基づき、イマザリルが 0.05、0.5、5 ppm の濃度レベルになるように添加した模擬検体を用い、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、85.2-98.8%と非常に良好な値を得ることが出来た。また、4 回繰り返し測定で同時再現性を検証したところ、1.8-6.6%と良好な CV 値を得、データの信頼性の面でも高い評価を得ることが出来た。

一方、従来の前処理法を用い、同様の濃度レベルで添加回収試験を実施した。その結果、0.05 ppm を添加したオレンジとグレープフルーツの試料においては、イマザリルを検出することが不可能であった。この原因として、C-3 で述べたように従来前処理法の精製効果が不十分であるため、オレンジとグレープフルーツに起因した夾雑物がイマザリルのピークを妨害したためであると言える。また、各濃度レベルでの平均回収率も IAC カラムを用いた場合より何れにおいて、低い値となった。従来前処理法では、多段階に渡る操作を必要とし、各工程内でのイマザリルの損失がこの結果に大きく反映しているものと考えられた。

更に、本カラムの実用性を評価するためにカリフォルニア産並びに、フロリダ産の市販の輸入柑橘類に対して適用した。Table 2 に示したように、市販柑橘類中残留イマザリルの測定結果においても従来前処理法で得られた結果よりも良好な結果を得ることが出来た。従って、本カラムは、実用性の面においても非常に有用であることが示唆された。

D. 結論

本研究では、柑橘類中イマザリル分析において、従来前処理法が抱える問題点を解決する目的で、免疫化学測定法の一つである IAC カラムを導入した。これを機器分析法とリンクさせることにより、試料調製の迅速化、検体処理能力の向上、並びにクリーンアナリシスを達成することが可能となった。また、簡便な操作で従来前処理法よりも高い精

製効果を得ることも可能であった。

今回の検討においては、一農薬に対する IAC カラムの開発を検討したが、今後は、数種類の抗体、若しくは類似構造農薬に対し、広い交差反応性を有する抗体を用い、IAC カラムによる多成分一斉分析法、若しくは系統別一斉分析法の開発を試みる予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

- [1] E. Watanabe, Y. Tsuda, S. Watanabe, S. Ito, M. Hayashi, T. Hayashi, Y. Yuasa, H. Nakazawa, *Anal. Chim. Acta* 424 (2000) 149-160.
- [2] E. Watanabe, S. Watanabe, S. Ito, M. Hayashi, T. Watanabe, Y. Yuasa, H. Nakazawa, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 5124-5130.
- [3] E. Watanabe, Y. Yoshimura, Y. Yuasa, H. Nakazawa, *Anal. Chim. Acta*, in press.

2. 学会発表

- [1] 渡辺栄喜、津田祐理子、大曾根知、渡辺卓穂、中澤裕之、渡邊繁幸、伊東茂寿、湯浅洋二郎:ELISA による玄米中イナベンフィドの分析、日本薬学会第 120 年会(岐阜、2000. 3)
- [2] 渡辺栄喜、湯浅洋二郎、中澤裕之:イムノアフィニティーカラムクлинаップ/HPLC による柑橘類中イマザリルの分析、日本食品化学学会第 6 回総会・学術大会(東京、2000. 5)
- [3] Eiki Watanabe, Yojiro Yuasa, Kumiko Sasaki, Hiroyuki Nakazawa: Immunochemical techniques for the rapid determination of azole fungicide imazalil in citrus fruits, Pittcon 2001 (New Orleans, LA, March, 2001)
- [4] Eiki Watanabe, Yuriko Tsuda, Tomo Osone, Hisaga Moritaka, Yojiro Yuasa, Hiroyuki Nakazawa: Immunochemical techniques for the simple and rapid determinations of imazalil and inabenfide in agricultural products, 221st ACS National Meeting (San Diego, CA, April, 2001)

【参考文献】

- [1] C. Tomlin, A World Compendium: The Pesticide Manual Incorporating The Agrochemical Handbook, 10th Edition, Crop Protection Publications, Thornton Heath, England, 1994; pp. 580-581.
- [2] 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、1995、pp. 349-351.
- [3] 外海泰秀、津村ゆかり、中村優美子、松木宏晃、伊藤誉志男、衛生化学 38 (1992) 270-281.
- [4] 川原章弘、山田真記子、加藤喜昭、中村幹雄、西島基弘、伊藤誉志男、Food & Food Ingredients J. Jpn. 163 (1995) 104-110.
- [5] Y. Yamazaki, T. Ninomiya, J. AOAC Int. 79 (1996) 787-790.
- [6] J. Garrido, M. de Alba, I. Jimenez, E. Casado, M. L. Folgueiras, J. Chromatogr. A 765 (1997) 91-97.
- [7] C. M. Torres, Y. Pico, J. Manes, J. Chromatogr. A 778 (1997) 127-137.
- [8] Y. Ito, Y. Ikai, H. Oka, J. Hayakawa, T. Kagami, J. Chromatogr. A 810 (1998) 81-87.
- [9] A. S. Harris, A. D. Lucas, P. M. Kramer, M.-P. Marco, S. j. Gee, B. D. Hammock, Use of immunoassay for the detection of urinary biomarkers of exposure, in: D. A. Kurtz, J. H. Skerritt, L. Stanker (Eds.), New Frontiers in Agrochemical Immunoassay AOAC International, Arlington, VA, 1995; pp.217-235.
- [10] H. Nagasaki, S. Watanabe, M. Kuroki, Y. Matsumoto, M. Murakami, N. Omoda, N. Kondo, H. Jinnai, H. Takaoka, Y. Matsuoka, J. Immunol. Methods 162 (1993) 235-245.
- [11] K. Morimune, Y. Yamaguchi, Y. Beppu, S. Miyake, S. Takewaki, M. Kawata, Y. Yuasa, Anal. Chim. Acta 376 (1998) 37-40.
- [12] S. Watanabe, S. Ito, N. Omoda, H. Munakata, M. Hayashi, Y. Yuasa, Anal. Chim. Acta 376 (1998) 93-96.
- [13] S. Miyake, S. Ito, Y. Yamaguchi, Y. Beppu, S. Takewaki, Y. Yuasa, Anal. Chim. Acta 376 (1998) 97-101.
- [14] E. Watanabe, Y. Tsuda, S. Watanabe, S. Ito, M. Hayashi, T. Watanabe, Y. Yuasa, H. Nakazawa, Anal. Chim. Acta 424 (2000) 149-160.
- [15] E. Watanabe, S. Watanabe, S. Ito, M. Hayashi, T. Watanabe, Y. Yuasa, H. Nakazawa, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 5124-5130.
- [16] J. Li, C. Qian, J. AOAC Int. 79 (1996) 1062-1067.
- [17] S. E. Katz, M. Siewierski, J. Chromatogr. 624 (1992) 403-409.
- [18] L. A. van Ginkel, J. Chromatogr. 564 (1991) 363-384.

Table 1 Recoveries of imazalil from spiked citrus fruit samples

Sample	IAC clean-up method ^a			Conventional clean-up method ^a		
	Imazalil spiked (ppm)	Mean±S.D. (ppm)	Recovery(%) CV(%)	Mean±S.D. (ppm)	Recovery(%) CV(%)	CV(%)
Lemon	0.05	0.04 ± 0.003	85.2	0.04 ± 0.004	83.0	9.0
	0.5	0.46 ± 0.016	92.0	0.43 ± 0.027	85.1	6.3
	5.0	4.51 ± 0.083	90.2	4.32 ± 0.223	86.4	5.2
Orange	0.05	0.05 ± 0.002	97.4	N. D.		
	0.5	0.48 ± 0.008	96.3	0.41 ± 0.030	82.5	7.3
	5.0	4.79 ± 0.099	95.8	4.29 ± 0.344	85.7	8.0
Grapefruit	0.05	0.05 ± 0.003	93.6	N. D.		
	0.5	0.49 ± 0.019	98.8	0.40 ± 0.033	80.8	8.3
	5.0	4.71 ± 0.194	94.2	4.27 ± 0.197	85.5	4.6

^a Average of 4 trials.

Table 2 Application to actual samples using IAC clean-up method

Sample	IAC clean-up method (ppm) ^a	Conventional clean-up method (ppm) ^a
Lemon (California)	1.32	1.18
Orange (California)	1.83	1.60
Grapefruit (Florida)	1.09	0.91

^a Values were based on a single analysis.

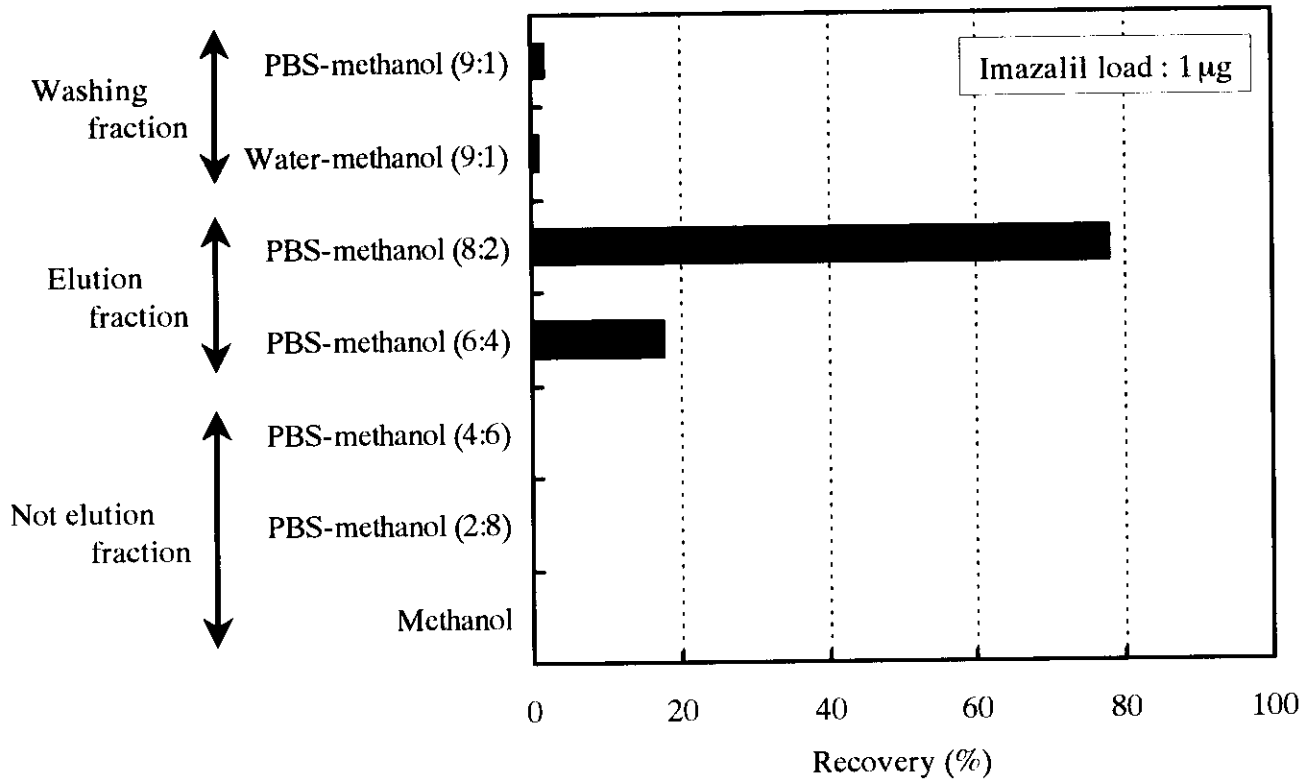


Fig. 1 Elution pattern of imazalil from IAC clean-up column

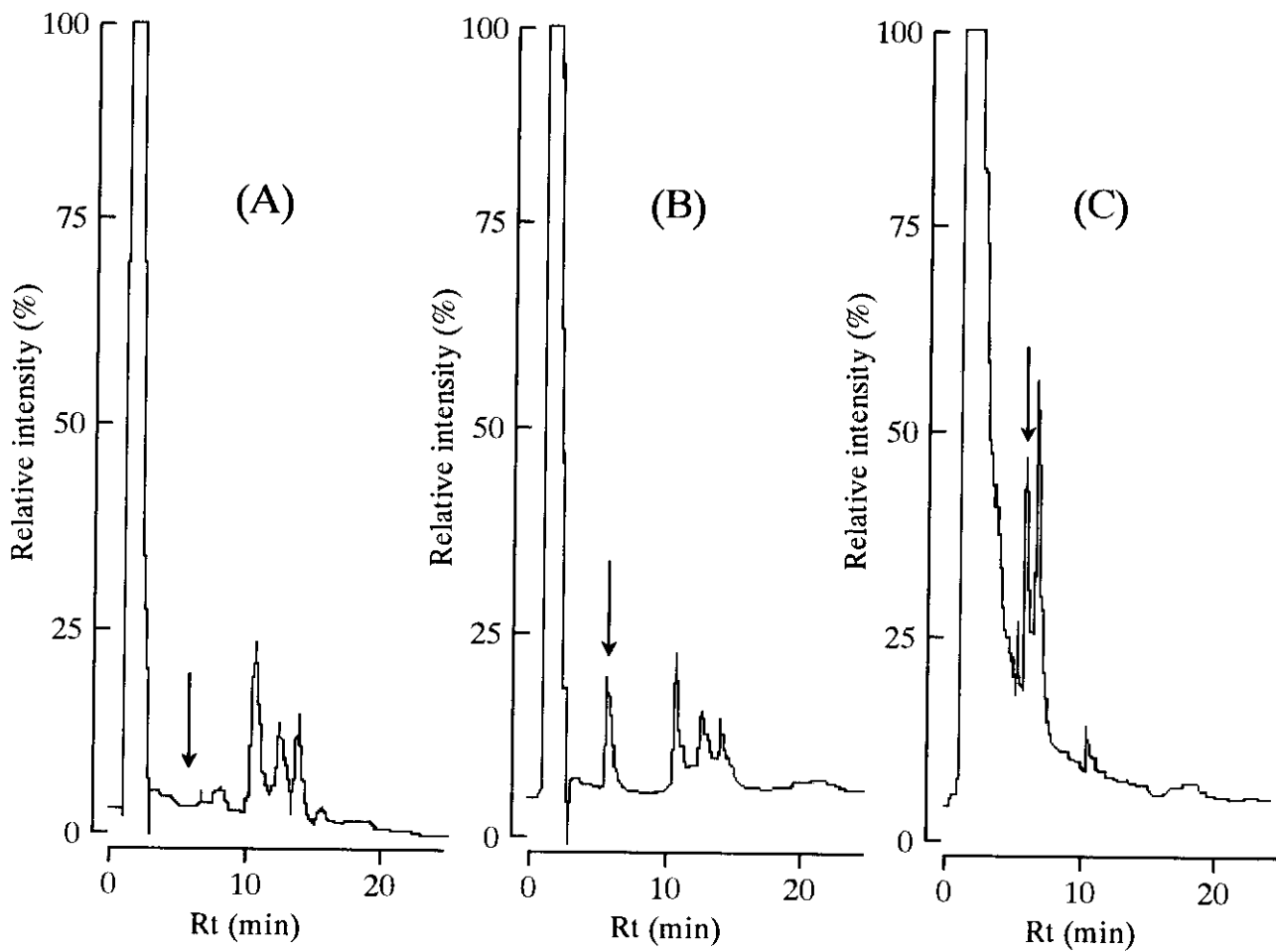


Fig. 2 Typical chromatograms of grapefruit

(A) Chromatogram of blank with IAC clean-up method

**(B) Chromatogram of grapefruit fortified with 0.5 ppm of imazalil
with IAC clean-up method**

**(C) Chromatogram of grapefruit fortified with 0.5 ppm of imazalil
with conventional clean-up method**

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、市販の残留農薬測定キットの有用性や問題点について検討した。本年度はこれまで検討してきた、ダイアジノン、アルジカルブおよびクロルピリホスについて、添加する農作物を決め、その回収率に対する共同比較試験を行うことを中心に検討した。その結果、これらのキットはいくつかの問題点はあるが、スクリーニング法として利用するにはおおむね妥当との結論を得た。

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生活科学部
食品研究科
野村孝一 (財)日本食品分析センター
多摩研究所応用試験部応用試験一課
上野英二 愛知県衛生研究所化学部
環境化学科

1)。これらのキットは競合酵素免疫法(競合 ELISA 法)を利用したものであるが、抗体をチューブまたはマイクロウェルにコーティングしたタイプ(商品名 EnviroGard®)と磁気ビーズに固定したタイプ(商品名 RaPID Assay®)がある。これら2種類の商品は、カタログ上同列に取り扱われているが、開発経緯の違いから感度や他の農薬との交差反応性にかかなりの違いが見られるといわれる。しかし、共通して、従来の機器分析と比べ、高価な設備や前処理に多量の溶剤を必要とせず、誰にでも迅速に検査できるとしている。

著者らは、これらキットの有用性や問題点を確認するため、平成10年度は、EnviroGard(ウェルタイプ)のダイアジノンとアルジカルブについて、平成11年度は、再度アルジカルブと RaPID Assay のクロルピリホスについて、その精度や感度について検討してきた。

本年度は、これらキットの結果を取りまとめる意味で、誰にでも迅速に検査できるかを確認するため、複数の機関において共同比較試験を中心に検討し、さらに EnviroGard と RaPID Assay の相違をみるためクロルピリホスキットにおいて比較検討したので報告する。

A. 研究目的

近年、遺伝子組換え作物の簡易分析法として、イムノアッセイや抗原抗体反応を利用したキットが注目されている。現在、イムノアッセイを利用したキットには、かび毒、残留農薬、内分泌攪乱化学物質などの検査用キットが販売されている。残留農薬検査キットに関して、国内で入手できるキットは、基本的には Strategic Diagnostics Inc.(SDI社)の製品のみであろう。SDI社のホームページ(<http://www.sdix.com/prodmenu.html>)には、農薬の欄に、30種を超えるキットが掲載されている(表

B. 研究方法

1. 添加回収実験用の農作物とその前処理

共同比較試験用に配布する農作物は、(財)日本食品衛生学会の農産物分類表¹⁾から検討した。配布した農作物とその残留基準を表 2 にまとめた。これらの農作物は、米(玄米)を除き、市販の無農薬表示農作物を購入し、使用した。

以下に各農作物の前処理について述べる。

1) 穀類

玄米(銘柄:あきたこまち)は、農薬として、ヒドロキシイソキサゾール(殺菌剤)、メタラキシル(殺菌剤)、クロタロニル(殺菌剤)、ベンスルフロンメチル(除草剤)およびメフェナセト(除草剤)が一度使用されたことが表示されている。

米は、製粉機で粉砕した。

2) ベリー類果実

いちごは、へたを除いた後、包丁で細かく切り均一化した。

3) 熱帯産果実

バナナは、外皮を除いた後、可食部のみを包丁で細かく切り均一化した。

4) かんきつ類果実

レモンは、外果皮と果肉部を分けずに包丁で細かく切り均一化した。

5) あぶらな科野菜

だいこんは、水で軽く洗った後、上部と下部を採取し、包丁で細かく切り均一化した。

6) いも類

ばれいしょは、水で軽く洗った後、包丁で細かく切り均一化した。

7) ゆり科野菜

たまねぎおよびねぎは、土壌の付着した外皮を取り除いた後、包丁で細かく切り均一化した。

8) その他の野菜

ほうれんそうは、変質葉を除去、葉の上部と下部を採取し、包丁で細かく切り均一化した。

2. 農作物に対する各農薬の添加量

ダイアジノン、アルジカルブおよびクロルピリホスの農作物に対する添加量と最終濃度を図 1、2 示した。各農薬の添加量は、最終濃度がカタログに

示された 50%Bo の値に配慮して決定した。

3. キットの操作

i) キット内容

・ **EnviroGard** (ダイアジノン、アルジカルブ、クロルピリホス)

固相抗体(96 ウェル)、農薬標準溶液(ダイアジノンおよびクロルピリホス)、酵素複合体溶液、陰性コントロール溶液(アルジカルブ)、基質溶液、発色溶液(アルジカルブおよびクロルピリホス)、反応停止溶液

・ **RaPID Assay** (クロルピリホス)

テストチューブ(108 本)、磁性抗体溶液、酵素複合体溶液、抗原標準溶液、抗原基準溶液、陰性コントロール溶液、発色溶液、反応停止溶液

ii) 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

・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

iii) 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)

・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)

・マイクロピペット

・ミリカップ(ミリポア社製 0.45 μm)

iv) 操作

・ **EnviroGard** (ダイアジノン、アルジカルブおよびクロルピリホス)の操作

操作は、おおむね以下ようになる。

①使用したい数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残留農薬試験用農薬またはキット内の農薬標準溶液を希釈して各濃度の標準溶液を調製する。

③ストリップのウェルに陰性コントロール、標準溶液、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(18 ~ 23 °C)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、よく振ってから中身を捨てる。これを5回以上繰り返す。
- ⑦基質溶液を各ウェルに滴下する。
- ⑧発色溶液を滴下する。
- 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溶液を加え、良くかき混ぜる。
- ⑪30分以内にマイクロプレートリーダーで吸光度(450 nm)を測定する。

結果は次の式より%Boを算出し、縦軸に%Bo、横軸に対数目盛で農薬濃度を表した検量線を作り、各試料溶液の農薬濃度を算出した。

$$\%Bo = \frac{\text{各ウェル(チューブ)の吸光度}}{\text{陰性コントロール溶液の吸光度}} \times 100$$

なお、カタログでは、%B/Boも使われているが、今回は%Boとした。

・RaPID Assay (クロルピリホス)の操作

- ①キットのすべての試薬をおよび試験溶液を室温とする。
- ②陰性コントロール溶液、試験溶液、抗原標準溶液、抗原基準溶液 250 μL を各チューブに分注する。
- ③全てのチューブに酵素標識抗原を 250 μL を分注する。
- ④磁性抗体溶液のバイアルを振り、内容を良く混合した後、すべてのチューブに 500 μL を分注する。
- 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チューブを取り付けたまま、溶液を捨てる。
- ⑧洗浄溶液 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、

各チューブに発色溶液を 500 μL を分注する。

- ⑩室温で20分間インキュベートする。
- ⑪反応停止溶液を 500 μL を分注する。
- ⑫15分以内に吸光度(450 nm)を測定する。

結果は、EnviroGardと同様に%Boを求めクロルピリホス濃度を算出する。

4. 交差反応性

昨年度は RaPID Assay のクロルピリホスに対しての交差反応性を検討した。そこで、本年度は、EnviroGard のクロルピリホスについて、昨年度と同様の農薬に関して交差反応性を求め検討した。各農薬は 1、50、500 ng/mL(1%MeOH/PBS)の溶液を調製し、その%Boを算出した。

C. 研究結果

1. 検量線について

各研究機関が作成した各農薬に対する検量線を図 3~6 に示した。数度に分けてキットを使う場合、検量線に再現性があれば限られた数のウェルやチューブ使用数を減らすことが可能となる。

ダイアジノンにおいては、2機関の検量線の傾きはあまり変わらず、どのキットにおいても直線性が得られたが、機関 2 においては Y 軸側の変動が大きかった。

アルジカルブにおいては、傾きおよび%Bo共に2機関の差異が大きかった。

クロルピリホスの EnviroGard と RaPID Assay の検量線は、傾きはあまり変わらなかったが Y の値が明確に感度の差を反映した。

なお、クロルピリホスの EnviroGard 担当の 1 機関において、農薬の標準品にクロルピリホスメチルを使用したため、6 倍ほど検量線が高い値を示した。

以上の結果から、定量の精度を高めるためには、測定ごとの検量線の作成が必要であると結論された。

2. 農作物における回収率の結果

農作物の残留農薬測定では、通常 Blank 値は

ないが、今回は Blank 値として無添加の農作物があるので、この値を引いて回収率を求めた。

i) ダイアジノン

図 7 にダイアジノンの添加回収実験の結果と標準偏差を示した。玄米を除くと 2 機関の結果に差異がみられたが、標準偏差も大きいことを考慮すると大きな差とはいえないと推察された。

ii) アルジカルブ

図 8 にアルジカルブの添加回収実験の結果を示した。いちご、バナナにおいて 1 機関の結果が 200%を越えていたので、図から省いた。原因は不明であり、今後検討したい。

iii) クロルピリホス (EnviroGard)

図 9 にクロルピリホスの EnviroGard における添加回収実験の結果を示した。ほうれんそうの結果で差異がやや大きい、どの農作物でも回収率が 50~100%の範囲でおおむね良好な結果であった。

iv) クロルピリホスでの EnviroGard と RaPID Assay の比較

図 10 にクロルピリホスの EnviroGard と RaPID Assay における添加回収実験の結果を比較して示した。キットに負荷する濃度は、EnviroGard で 0.2 ppb、RaPID Assay で 1 ppb と 5 倍違うが、回収率の上では、ほうれんそう以外さほど大きな差異は認められなかった。

RaPID Assay のほうれんそうの回収率はかなり低い、これは農薬無添加のほうれんそうの %Bo がかなり高い値を示したことに起因する。

3. クロルピリホスの EnviroGard における交差反応性

表 3 にクロルピリホスの EnviroGard における交差反応性を示した。なお、比較のために昨年度クロルピリホスの RaPID Assay での結果を併せ記載した。RaPID Assay でほとんど交差反応性が認められなかったトリクロピル(図 11)にやや大きな交差性がみられたが、50%Bo の値は農作物換算では 3.4ppm となり、実際にはほとんど影響しないものと考えられた。

なお、トリクロピルは、ゴルフ場などで使われる除

草剤で残留基準はない。

D. 考察

1. 検出限界

検出限界は、キット測定において重要な検討課題である。表 4 に今回検討したキットのカタログ上の検出限界を、表 5 にキットから実測して求めた各農薬の検出限界を示した。検出限界を %Bo の何%にするか重要であるが、カタログでは 85%、90%があり、クロルピリホスの EnviroGard のように表示されていないもの(予想では 90%)もあった。実測値とカタログ値を比較するとダイアジノン (EnviroGard)、クロルピリホス (EnviroGard)、クロルピリホス (RaPID Assay) においてはほとんど同じ検出限界であったが、アルジカルブ (EnviroGard) においては、カタログ値よりかなり高い値を示した。検出限界の最大 2,260 ppt の場合、試料重量で換算すると約 0.1 ppm となり、玄米やばれいしょでは残留基準を上回る事となる。しかし、これらの作物に意図的にアルジカルブが使用される可能性はほとんどなく、可能性があるバナナなどでは十分な感度といえる。

2. 回収率と精度について

検査方法を評価するとき、真度(回収率)および精度(併行・日間再現性)は、必ず確認しなければならないとされる²⁾。この回収率は、一般的に 70 ~ 120%の回収率が望まれる。

今回の共同比較試験の結果では、クロルピリホス (EnviroGard) のねぎで 2 機関とも回収率が 70%を下回る値を示した。また、クロルピリホスの EnviroGard と RaPID Assay の比較ではほうれんそうがかなり低い値を示した。これらの結果に共通していえることは、農薬無添加の農作物の Blank 値が高く、このため相対的に回収率が低い値を示した。ねぎ、ほうれんそうに対するクロルピリホスの残留農薬基準は 0.01ppm、一方、表 4 から求めた農作物換算での EnviroGard の検出限界が 0.018ppm (操作上、あと 10 倍程度の希釈が可能)、RaPID Assay の検出限界が 0.007ppm にな

る。従って、ねぎおよびほうれんそうに対するキットの結果は、他の分析方法と組み合わせるなどして慎重に判断すべきものと推察された。

精度に関しては、ダイアジノンの標準偏差が示す通り(図 7)、必ずしも良好とはいえないが、キット感度の高いことでスクリーニング法としては、問題ないものと推察された。

E. 結論

1. 残留農薬用イムノアッセイキットを総括して

SDI 社のホームページ(<http://www.sdix.com/prodmenu.html>)を見ると、残留農薬キットが 30 種以上掲載されているが、在庫の農薬は少なく、注文を受けてから製作にかかるようである。この場合の受注個数は農薬により違うが、最低でも 5 キットは必要と思われる。品質保証期間が短いものでは、数ヶ月のものもあり、1 キットの価格が定価で 9 万円以上することも合わせ、キットを使用するうえでの障害となる。また、在庫品も品質保証期間を考えて購入する必要がある。ただし、品質保証期間を多少過ぎた程度では、それまでの管理状態によるが実用上あまり問題とはならない。

EnviroGard のウェルタイプは、検出感度が高く、交差反応性を示す農薬も少ないが、取り扱うウェルが小さく、ピペット操作などに習熟しないとその利点を生かすことができない。

RaPID Assay タイプは、チューブが小型試験管サイズなので試料数が自由に決められ、また、EnviroGard に比べピペット操作等が楽で、さほどの習熟を必要としない。ただ、磁気ラックが必要なこと、感度が全体にやや低いことおよび交差反応性を示す農薬が多いことが問題である。

以上から、これらキットを使うにはやはりある程度の技術の習得が必要であり、農作物によってはその感度や交差反応性を考慮すべきであるが、特定の残留農薬を測定する目的であれば、スクリーニング法として有用な手段となりうるものと判断できた。

【参考文献】

- 1) 日本食品衛生学会: 日本衛生学雑誌, **42(1)**, J72(2001).
- 2) 松田りえ子: 食品衛生研究, **48(12)**, 59-66(1998).

【ダイアジノン】

農作物 10 g

- ← Diazinon standard 1 μ g (MeOH 等で調製) 添加
- 2 時間放置
- ← MeOH 40 mL 添加
- 10 ~ 20 分間振とう

ろ過 (ろ紙 No. 2 またはミリカップ)

ろ液 1 mL 分取

PBS で 200 mL へ定容 (最終濃度 100 ppt)

EnviroGard(ウェルタイプ)に負荷

【アルジカルブ】

農作物 10 g

- ← Aldicarb standard 2.5 μ g (MeOH 等で調製)
- 2 時間放置
- ← MeOH 40mL 添加
- 10 ~ 20 分間振とう

ろ過 (ろ紙 No. 2 またはミリカップ)

ろ液 1 mL 分取

PBS で 10 mL へ定容 (最終濃度 5 ppb)

EnviroGard(ウェルタイプ)に負荷

図 1 ダイアジノンおよびアルジカルブの添加量と最終濃度