

酵素標識免疫測定法 (ELISA) を利用した 殺虫剤メソミルの作物残留農薬分析への適用評価

清水克彦*

要 約

酵素標識免疫測定法 (ELISA) を利用した市販メソミル測定キットを用いて、イチゴなど5作物について残留農薬分析を行い以下の結果を得た。

- 1 回収率及び変動係数について、供試作物のピーマン、レタス、タマネギ、ダイコンで良好な結果が得られた。
- 2 公定法であるガスクロマトグラフ法による分析値にも近い値が得られた。

Evaluation of the Commercial ELISA Kit in the Analysis of Methomyl in Agricultural Products

Katsuhiko SHIMIZU

キーワード：残留農薬, ELISA, メソミル

緒 言

近年、抗原抗体反応を利用した酵素標識免疫測定法(以下「ELISA」とする。)による残留農薬分析の研究が注目されている。この方法は、分析時間が短く、測定機器も簡易なものでよいため、生産現場での出荷物検査等に利用が期待できる。

そこで、野菜で広く使用されている殺虫剤メソミルを対象し、市販の残留農薬測定キットを用いて、作物残留農薬測定への適用評価と機器分析との比較を行った。

材料及び方法

1. 試験1：ELISAによる作物中のメソミルの測定精度

ELISA キットは、SDI 社製メソミル測定キットを供試した(以下、「ELISA キット」とする.)。定量に伴う吸光度測定は、IMUNO-MINI (NJ-2300) で行った。メタノールについては残留農薬分析用を用いた。

添加回収試験は、メソミル標準品(和光純薬製：純度98.0%以上)をメタノールに溶かし、10ppmに希釈した溶液(以下「メソミル標準液」とする。)を各種作物に添加した。供試作物は、メソミルの散布歴のないイチゴ、ピーマン、レタス、タマネギ、ダイコンを用いた。分析試料は、細断し、ミキサーにより磨砕均一化したもの10gに、メソミル標準液を1ml添加した(試料新鮮重当たり

1ppm.)。

抽出操作は、メタノール40mlを加え30分間の振とうにより行った。その後、ろ過し、メタノール濃度がELISAキットの測定に影響がないように蒸留水で50倍に希釈した。

測定は、キット所定の手法により行った。専用試験管ラックにプラスチック製試験管をセットし、抽出液の200 μ Lを分取した。さらに250 μ Lの酵素標識抗原を加えて攪拌した後、磁性抗体500 μ Lを加えて再度攪拌した。室温で静置し30分間反応させた。専用ラックに磁石部を合わせて抗体を固定してから、未反応の抗原をキット付属の洗浄液で除去した。3回の洗浄を行い洗浄液を捨てた後、500 μ Lの発色液を添加し、20分間発色させた後、500 μ Lの反応停止液を加え、450nmの吸光度を測定した。分析は2連で行い、測定は各2回行った。

2. 試験2：ELISAキットと機器分析法との整合性

供試作物は、露地栽培された収穫期のレタスを用い、ランネート水和剤(メソミル45%含有)の450ppm(1000倍希釈)、225ppm(2000倍希釈)、45ppm(10000倍希釈)、22.5ppm(20000倍希釈)を200L/10a相当量散布し、薬液が乾いてから結球部を採取した。分析試料は、細断し、磨砕均一化して分析に供した。ELISAキットによる測定は、試験1と同様の操作で行った。機器分析には、ガスクロマトグラフ日立FPD(S)検出器付163型を用いた(以下、「GC法」とする.)。分析は、告示法³⁾に基づき、試料10gからアセトンで抽出し、ジクロロメタンに転溶

2005年8月31日受理

*兵庫県立農林水産技術総合センター部長(農林水産環境担当)

後、アルカリ条件下でメソミルをメソミルオキシムに加水分解して、測定を行った。分析は2連で行った。

結果及び考察

1. 試験1: ELISAによる作物中のメソミルの測定精度

ELISAキットによる各作物における添加回収試験の結果を表1に示した。

検量線は、横軸にメソミル濃度(ppb)を、縦軸に2%メタノール水溶液を用いたもの(試薬ブランク)の吸光度と標準液の吸光度との比を用いて作成した(図1)。

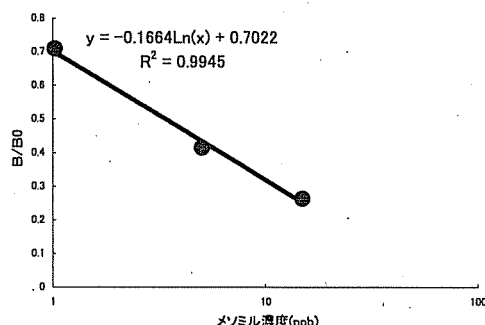


図1 ELISAキットのメソミル検量線

表1 ELISA(メソミルキット)による添加回収試験

作物		回収率(%)	CV
イチゴ	A	81.0	24.0
	B	114.6	20.9
ピーマン	A	90.9	12.8
	B	111.0	11.8
レタス	A	104.2	6.8
	B	118.5	6.4
タマネギ	A	98.4	12.3
	B	121.1	11.3
ダイコン	A	77.9	16.8
	B	112.8	14.5

注: 添加濃度 1 ppm

A; メソミル無添加試料の吸光度との比から計算した。

B; 試料抽出液の代わりに2%メタノール溶液を用いたときの吸光度から計算した。

表2 2%メタノール溶液及び各作物の抽出液における吸光度

作物	回収率(%)	CV
2%メタノール溶液	0.92	(100)
イチゴ	0.80	(87)
ピーマン	0.85	(92)
レタス	0.87	(94)
タマネギ	0.84	(91)
ダイコン	0.79	(85)

() はメタノール溶液を100としたときの比率

試料の測定は、まず検量線と同様に試薬ブランクの吸光度と各試料の吸光度との比からメソミルの濃度を求めた。この方法で回収率を計算すると、最も低い回収率が、ピーマンで111.0%、最高がタマネギの121.8%となり、供試した5作物について100%を越える結果となった(表

1)。この原因としては、供試作物の成分による抗体の影響が報告されており^{1,2)}、今回についても同様のことが予想された。そこで、メソミルを添加しないで各作物からのメタノール抽出液(以下、「試料ブランク」とする。)の吸光度を測定した(表2)。いずれの作物においても吸光度は10~15%程度低下しており、作物成分により抗体の感度に変化していることがわかった。この値と各試料の添加回収試験の吸光度の比から回収率を計算したところ、回収率が最大でダイコンの112.8%から77.9%へと34.9%低下した(表1)。また、他の作物でも回収率は低下した。しかし、いずれの計算方法においても機器分析法で通常求められる75~120%の範囲にはほぼ入っており、どちらの定量法でも実用性には問題ないと言える。また、分析法の再現性を示す変動係数(CV)は、イチゴで20%を越えていた以外は、許容範囲内であり問題はなかった。

2. 試験2: ELISAキットと機器分析法との整合性

今回供試した作物の中で回収率が良好で、変動係数も最も小さかったレタスを用いて、同じ分析試料をELISAとGC法で分析を行った。ELISAでは、試料ブランクの吸光度と各試料の吸光度との比から定量を行った。その結果、GC法との測定値との相関は0.99、近似曲線の傾きも1.1となり両者は非常に近い値となった(図2)。

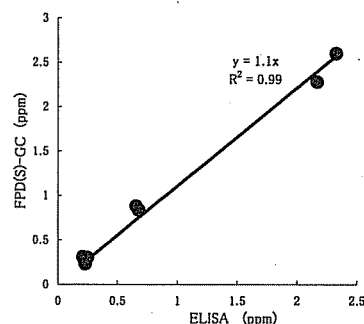


図2 レタスにおけるメソミルのELISAとガスクロマトグラフ法との測定値の相関

以上のことからELISAによる作物残留農薬の分析は、十分な精度もあり、公定法である機器分析法にほぼ近い値を示すことがわかった。しかし、作物によっては、抗体に影響を与え、測定値やその再現性に問題を生じる場合がある。このため、予め対象とする作物について回収試験で精度を確認しておく必要がある。

引用文献

- 天野昭子・小林忠彦(2003): 関西病虫研報45, 107-108
- 小林由美・佐藤健一・中村幸二(2005): 第30回日本農薬学会講演要旨, 119
- 「今月の農業」編集室編(1998): 改訂3版 農薬登録保留基準ハンドブック, 化学工業日報社, 894-896