

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）ELISA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

イマザリルは、イミダゾール系殺菌剤として、主に輸入柑橘類に対し、貯蔵、保存中の腐敗防止を目的にポストハーベスト農薬として使用されている農薬である。近年、輸入農産物量が増大する中、迅速且つ簡便な分析法の開発が急務とされている。イマザリルは、輸入柑橘類からの検出頻度が非常に高いことが知られている。このような実態からも、多数の検体を対象とした迅速なスクリーニング法が開発が要求されている。

本研究では、柑橘類成分の影響を受けることのない ELISA を用いた柑橘類中のイマザリル分析法を構築し、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 と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

林 昌郎 (株)コスモ総合研究所

に渡っており、時間を要する。更に、多量の有機溶媒の消費による分析者に対する健康影響も無視することは出来ない。

A. 研究目的

イマザリル(1-(β -allyloxy-2,4-dichloro-phenethyl)imidazole)は、イミダゾール系殺菌剤として、特に、輸入柑橘類に対し、貯蔵、保存中の腐敗防止を目的にポストハーベスト農薬として広範に使用されている農薬である。日本国内においては、食品添加物(防かび剤)として指定されており、平成5年9月に食品衛生法に基づき、レモン、オレンジ及びグレープフルーツに対して 5ppm と残留農薬基準値が設定された。日本国内に輸入された柑橘類からの残留イマザリルに関する報告は多く、これに対応すべく迅速且つ簡便なイマザリルの残留分析法の開発が要求されている。従来より、イマザリルは、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた方法により、分析が行われている。しかし、この分析法では、HPLC 分析を行うまでの抽出、クリーンアップ等の試料調製が多段階

免疫化学的測定(ELISA)法は、簡便且つ迅速に農薬を測定できる方法として近年、注目されている。本研究では、検出頻度の高いレモン、オレンジ及びグレープフルーツを用いたイマザリルの ELISA 法の条件検討を行い、有用な知見を得たので報告する。

B. 研究方法

B-1. 精製抗体の作製方法

直接競合阻害 ELISA に必要な精製抗体を得るために、抗イマザリルモノクローナル抗体産生細胞を用いてマウス腹水を作製した。

予め Pristane (2,6,10,14-tetramethylpenta-decane) を腹腔内に投与したオスマウスに選抜した増殖期の抗イマザリルモノクローナル抗体産生細胞 5×10^6 個を腹腔内に注入した。約1週間後、腹部の肥大したマウスより腹水を採取した。腹水を

2,500rpm、20分間遠心し、脂質層及び血球成分以外の部分を腹水中間層として回収した。得られた腹水中間層 4mL を採取し、飽和硫酸濃度が約33%となるように飽和硫酸水溶液 2mL を加えて塩析した。腹水を攪拌しながら、飽和硫酸水溶液をゆっくりと添加し、硫酸と腹水中間層の混合液を 4℃、10,000rpm で 20分間遠心した。遠心後、沈殿物を回収し、10mM リン酸塩緩衝液(PBS、pH7.2)1mL に溶解した。更に、一晚、4℃、PBS で透析し、精製抗体を得た。抗体濃度は、精製 IgG 1mg/mL の 280nm における吸光度 1.4 を吸光係数として用いて算出した。

B-2. 西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合イマザリルハプテンの作製方法

標識酵素として用いた西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)とイマザリルハプテンを活性化エステル法に基づき調製した。イマザリルハプテン 0.2mmol を秤量し、ジメチルホルムアミド(DMF)1mL に溶解した。N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)及びジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)をそれぞれ 0.2mmol 秤量し、先の DMF 溶液に添加後、室温にて 4 時間反応させた。反応後、遠心にて沈殿物と分離し、上清のみを回収した(1液)。HRP 25mg を秤量し、PBS 2.5mL に溶解した。HRP 溶解液に DMF 525 μ L をゆっくりと加え、十分に攪拌した(2液)。次に、1液 125 μ L を 2液に滴下し、その後、4℃にて 16 時間反応させた。反応終了後、PBS にて透析し、溶液を回収した。HRP 結合イマザリルハプテン濃度は、HRP 1mg/mL の 403nm における吸光度 2.275 を吸光係数として用いて算出した。

B-3. 直接競合阻害 ELISA

イマザリル濃度を測定するために、HRP 結合イマザリルハプテン及び抗イマザリルモノクローナル抗体を用い、直接競合阻害 ELISA を行った。B-1 で得られた精製抗イマザリルモノクローナル抗体を 10mM PBS で 10 μ g/mL に希釈し、96 ウェルマイクロタイタープレート(住友ベークラ

イト社製)に 50 μ L/ウェルで添加し、一晚、4℃にて固相化した。固相化後、希釈液を捨て、ブロッキング溶液(大日本製薬社製液状ブロックエースを蒸留水で 4 倍に希釈して使用)を 300 μ L/ウェルで添加し、一晚、4℃にてブロッキング処理した。

メタノールに溶解した各濃度のイマザリル 50 μ L と 10mM PBS 450 μ L を混和し、PBS で希釈した HRP 結合イマザリルハプテン溶液 500 μ L を添加した混合液を試験液とした。この試験液を 50 μ L/ウェルで添加し、25℃、1 時間反応させた。反応終了後、PBS で 5 回洗浄(B/F 分離)し、2mg/mL *o*-フェニレンジアミンと 0.02% 過酸化水素を加えた 0.1M リン酸クエン酸緩衝液(pH5.0)を 50 μ L/ウェルで添加し、室温にて 10 分間、発色させた。発色後、0.5M 硫酸により反応を停止させ、490nm の吸光度で測定することにより柑橘類中のイマザリル濃度を求めた。

B-4. ELISA 用柑橘類抽出液の調製方法

破碎した各種柑橘類 10g を採取し、これにメタノール 20mL を加え、1 時間振盪抽出した。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 50mL に定容した(5 倍希釈)。抽出液を PBS で 10 倍に希釈したものを被験液として直接競合阻害 ELISA に供した。

B-5. HPLC 用柑橘類抽出液の調製方法

破碎した各種柑橘類 20g を採取し、これに 1M 水酸化ナトリウム 5mL 及びアセトン 100mL を加えて、30 分間振盪抽出した。振盪後、吸引ろ過し、残渣にアセトン 50mL 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に負荷し、酢酸エチル 100mL 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 1M 水酸化ナトリウム 10mL 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。残留物をメタノ

ール-水(8:2v/v)に溶解し、5mL に定容したものを HPLC 分析に供した。HPLC 測定条件を Table 1 に示した。

C. 研究結果

C-1.メタノールによる抗イマザリルモノクローナル抗体への影響

イマザリルの水に対する溶解度は、20 °Cにおいて 0.18g/L、メタノールでは、500g/L であり、水に対して難溶である。柑橘類からの抽出においては、水では、イマザリルが殆ど抽出されず、メタノールのような有機溶媒による抽出操作が必要である。本節では、抽出溶媒として、メタノールを選択し、メタノールが抗イマザリルモノクローナル抗体の有する直接競合阻害 ELISA の感度に与える影響に関して検討した。固相化濃度を 10 μ g/mL、緩衝液として 10mM PBS、HRP 結合イマザリルハプテンの最終濃度を 15.625ng/mL になるよう調製し、反応を 1 時間、25 °Cで行い、メタノール最終濃度を 1、5、10、20 及び 30%として検討した際に得られた標準曲線を Fig.1 に示す。

Fig.1 よりメタノール最終濃度が 1 ~ 20%においては、十分な吸光度が得られたが、30%とした場合、著しく吸光度が低下し、反応性の減少が認められた。それぞれの濃度における抗イマザリルモノクローナル抗体が示した 50%阻害率(IC₅₀)は、1 ~ 10%においては、2 ~ 6ng/mL、20%においては、15ng/mL、30%においては、80ng/mLであった。これより、メタノールの最適添加濃度を 10%以下とした。

C-2. 柑橘類抽出液の直接競合阻害 ELISA への影響

レモン、オレンジ及びグレープフルーツ抽出液を調製し、各種柑橘類抽出液の直接競合阻害 ELISA への影響に関して検討した。

メタノール及び各種柑橘類抽出液に既知濃度のイマザリルを添加し、直接競合阻害 ELISA を

行なった。標準溶液及び抽出液の反応曲線は良く一致した(Fig.2)。また、阻害曲線を検討したところ、イマザリル標準溶液と各種抽出液の阻害曲線は、ほぼ一致していた(Fig. 3)。なお、Fig. 2 には、グレープフルーツ、Fig. 3 には、オレンジのみをそれぞれ示した。

C-3.直接競合阻害 ELISA と HPLC との相関性試験

前述の条件を用いて、HPLC との相関性を検討した。濃度レベルを 0.05 ~ 6ppm とし、相関性を検討した。レモンでは、ELISA と HPLC との間の相関係数(r)が 0.996、傾きが 0.893、オレンジでは、r が 0.997、傾きが 0.805、グレープフルーツでは、r が 0.997、傾きが 0.98 となり、双方の間には、高い相関関係が認められた(Fig. 4)。

D. 考察

輸入農産物の増大に伴い、農産物中に残留する農薬を迅速且つ簡便に分析する方法の開発が急務とされている。イマザリルは、輸入柑橘類、特にレモン、オレンジ及びグレープフルーツからの検出率が高い。本研究の ELISA による分析方法は、重要性の高いものと考えている。

本研究で確立した直接競合阻害 ELISA の有用性を従来法の HPLC 分析とクロスチェック試験した結果、3 種柑橘類ともに、両者の間には、高い相関関係が認められた。

これらの知見より、本研究で開発したイマザリルの ELISA 分析は、柑橘類、特に、イマザリルの残留頻度が高い輸入レモン、オレンジ及びグレープフルーツへの適応に有用性が高いと考えられた。

E. 結論

輸入農産物の増大に伴い、迅速且つ簡便な残留農薬分析法の開発が急務とされている。本研究では、輸入柑橘類からの検出頻度の高いイマザリルを簡便且つ迅速に分析できる分析方法の開発を

目的に、ELISA の条件検討を試みた。抽出液を直接、分析に供することができる ELISA は、その分、抽出液中の柑橘類成分の妨害を受けやすいことが知られているが、本研究においては、良好な結果を得ることが出来た。確立した ELISA 分析条件を用い、従来からイマザリルの理化学的試験法として使用されている HPLC との相関性を検討した。3 種柑橘類ともに、両者の間には、高い相関関係が得られた。

以上の結果から、本法は、有用性が高い分析方

法であることが示唆された。今後、本分析法を用い、市販農産物への適応を検討し、実用化に向けたイマザリルの ELISA の確立を行う必要があると考えている。

F. 研究発表

本研究の一部の内容は、第 76 回日本食品衛生学会 学術講演会(1998 年 11 月、新潟)において発表した。