

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 (2) ピリミカーブの残留分析のための免疫化学的測定法の開発

分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学教授

研究要旨

カーバメート系殺虫剤であるピリミカーブについて免疫化学的分析法の開発を行った。本研究においては、ヘテロログスなELISA測定系が、高感度化のための技術として有用な手法であることを例証するとともに、ピリミカーブの残留分析に応用可能なELISA法の基礎を構築した。

研究協力者

竹脇 俊一 株式会社ヤトロン

テン（表1）と西洋ワサビペルオキシダーゼ（POD）を結合させ、酵素標識化ハプテンを製した。

A. 研究目的

カーバメート系農薬であるピリミカーブは、例えば殺虫剤「ピリマー水和剤」の主成分であり、アブラムシに即効的に効き、有機リン系の殺虫剤に抵抗性のアブラムシにも有効である。リンゴ、モモ、ウメ、ミカン、キュウリ、ナス、トマト、ダイコン、キャベツ、ジャガイモ、バラ、キク、タバコと幅広い作物で、防除のために散布されており、農産物の生産現場はもとより流通途上において迅速な残留分析が望まれていることから、免疫アッセイ開発研究の対象として取り上げた。

まず、ピリミカーブハプテンを各々 $3.5\mu\text{mol}$ ジメチルスルホキシド（以下DMSO） $50\mu\text{l}$ に溶解した。次にこれらの溶液にN-ヒドロキシコハク酸イミド（ $5\mu\text{mol}$ ）をDMSO $10\mu\text{l}$ に溶解して添加後、さらに1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド（ $4\mu\text{mol}$ ）をDMSO $20\mu\text{l}$ に溶解し、添加した。室温にて1.5時間反応させた。この反応溶液に85mMホウ酸緩衝液（pH8.0） $500\mu\text{l}$ に溶解したPOD 10mg を添加し、再び室温にて1.5時間反応させた。反応終了後、ダルベッコのリン酸緩液（以下PBS（-）と略す）に対し 4°C 、一晚透析し、ピリミカーブとPODとの結合体を各々調製した。

B. 研究方法

B-1. ピリミカーブハプテンの構造

測定法の開発に使用した各ハプテンの構造を表1に示す。

抗体作製のためタンパク質に結合して免疫原として用いたハプテンはEIT-27である。

B-2. 酵素（ペルオキシダーゼ）結合ハプテンの作製

活性エステル法により、ピリミカーブハプ

B-3. ボックスタイトレーション

モノクローナル抗体（PMC27-29）を種々の濃度でPBS（-）に溶解し、96ウエルのマイクロタイタープレートに $100\mu\text{l}$ で添加後、 4°C で1晩静置することにより、固相化した。次に $300\mu\text{l}$ /ウエルでブロッキング緩衝液 {1%BSAと60mM NaClを添加した85mMホウ酸緩衝液（pH8.0）} に置き換え、室温で1時間ブロッキングした。このウエルを洗浄液（60mM NaClを添加

したホウ酸緩衝液)で洗浄した後、B-2で作製したピリミカーブハプテンのPOD標識体の希釈液を100 μ l/ウエルに加え、室温で1時間反応した。洗浄液で3回洗浄した後、ペルオキシダーゼの基質溶液 {3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン(100 μ g/ml)、0.006%過酸化水素を添加した0.1M酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5)} で10分間発色させ、1N硫酸で反応停止後、450nmの吸光度を測定した。

B-4. モノクローナル抗体(PMC27-29)の精製

まず、抗体産生ハイブリドーマをダルベッコ/10%FBS (牛胎児血清) 培地を用いて培養した。その培養上清に50%飽和となるように硫酸を加え、4°Cで1晩攪拌した。生じた沈殿物に蒸留水を加えて可溶化した後、PBS(-)で透析し、Avid ALゲル (バイオプローブ インターナショナル社) からイムノクロマトグラフィによって精製した。

B-5. 直接競合阻害ELISA法

直接競合ELISA法は以下の手順で実施した。精製したモノクローナル抗体PMC27-29を4 μ g/mlの濃度で50mM炭酸ナトリウム緩衝液(pH8.3)に溶解し、96ウエルのマイクロタイタープレートに100 μ l/ウエルで加えた後、4°Cで1晩静置することにより固相化した。次に、300 μ l/ウエルでブロッキング緩衝液 {1%BSAと60mM NaClを添加した85mMホウ酸緩衝液(pH8.0)} に置き換え、室温で1時間ブロッキングした。

また、このプレートとは別に各々60mM NaClを添加した85mMトリス緩衝液 (pH8.0) で適当な濃度に希釈したピリミカーブ溶液とペルオキシダーゼ結合ハプテンを混合し、ブロッキングしたプレートに100 μ l/ウエルで加えた後、室温にて1時間反応した。洗浄液 (60mM NaClを添加したホウ酸緩衝液) で3回洗浄した後、ペルオキシダーゼの基質溶液で発色させ、450nmの吸光度を測定した。

C. 研究結果

C-1. ボックスタイトレーションによる抗体固相化量とペルオキシダーゼ結合ハプテン量の決定

図1にボックスタイトレーションの結果を示す。モノクローナル抗体PMC27-29を1 μ g/ml~8 μ g/mlの範囲でpH8.3 (炭酸緩衝液) の条件で固相化し、それに対するPOD-EIT27の反応性を調べ、固相化抗体量とPOD-ハプテン量の至適量を求めた。

抗体量は4 μ g/ml以上でプラトーに達し、測定系では吸光度2前後のブランク値が好ましいことから、POD-ハプテン量は0.3 μ g/ml~1.0 μ g/mlの濃度範囲が適当と認められた。

C-2. ヘテロログスな直接競合阻害ELISA法による感度の比較

酵素 (POD) 標識ハプテンとして用いるハプテンの種類を変え (表1)、測定系の高感度化を試みた。免疫原に用いたEIT27より、側鎖構造を異にした類縁化合物EIT135を用いた方が、約3倍から5倍検量線が高感度側にシフトし、測定系の増感を図ることができた (図2)。

従って、酵素標識化ハプテンとしてはPOD-EIT135を用いることとした。なお、EIT134とEIT140についてはEIT26と同程度であった。

C-3. POD-EIT135を用いた反応条件

ハプテンとしてEIT135を用いた場合の酵素標識化ハプテンの濃度と抗体固相化量を再度求めた。前記の結果 (C-1) より抗体固相化量を4 μ g/mlとした条件で、0.3 μ g/mlと0.6 μ g/mlの酵素標識化ハプテン量を比較した。結果を図3に示す。吸光度2付近のブランク値を示す0.3 μ g/mlを至適濃度として選定した。

C-4. 直接競合ELISA法におけるpHの影響

反応条件としてpH依存性を調べた (図4)。pH5~pH10までの検討結果、pH8とpH9のトリス塩酸緩衝液 (150mM NaClを含む100mMトリス緩衝液) が最も反応性が高かった。中性により

近い反応条件がよいと考え、pH8を反応pHとして採用した。

C-5. 直接競合ELISA法におけるメタノールの影響

図5は、酵素標識化ハプテンとしてPOD-EIT135を用いた場合の直接競合ELISA法のメタノール耐性を示す。メタノール濃度の上昇に伴い、吸光度の減少および測定範囲のシフトがやや認められるが、10%程度まで使用可能と考えられ、これを測定条件とした。

C-6. ピリミカーブおよびその類縁化合物との交差反応性

モノクローナル抗体PMC27-29を用いた直接競合阻害ELISA法（酵素標識化ハプテン：POD-EIT135）のピリミカーブおよびその類縁化合物との交差反応性を比較検討した。反応性は、これらの化合物未添加時の吸光度を50%阻害する濃度を各々IC50値として、表2に示した。代表的な関連化合物の中ではピリミカーブにほぼ特異的（IC50：34ng/ml）であった。

D. 考察

直接競合阻害ELISA法を構築するのに、ヘテロログスな測定系、すなわち抗体作製のために用いた免疫用ハプテンと構造類似の化合物を酵素標識用のハプテンとして用いることが、測定系の感度を高める上で非常に有用な手法であることを本研究で例証した。これは、酵素標識用ハプテンを選択する際に、抗体との

親和性が免疫に用いたハプテンよりもやや低くなるような化合物を酵素標識用ハプテンとして選択することで、抗体による認識が低下し、平衡状態が抗体-測定対象物質（抗原）複合体へとシフトし、その結果、抗体と酵素標識化ハプテンとの会合が抑えられて感度増大をもたらすものと考えられる。

これにより、野菜・果実等の農産物における残留基準値から見て、ピリミカーブの残留分析への応用が可能な免疫化学的測定系の基盤が整った。

E. 結論

ピリミカーブを免疫化学的に測定することを目的として、モノクローナル抗体を用いた直接競合阻害ELISA法の基盤研究を行った。免疫抗原に用いたハプテンを酵素標識化ハプテンとした場合、測定範囲は約5~500ng/mlであったが、構造の異なるハプテンとしたヘテロログス法では、約3倍測定感度の上昇が認められた（約2~200ng/ml）。また直接競合阻害ELISA法によるピリミカーブおよびその類縁化合物に対する交差反応性の検討では、ピリミカーブに対する特異性の高さが確認された。食品衛生法に基づくピリミカーブの残留基準値が果物・野菜で0.5~5ppmであるため、本測定系での応用が可能と考えられる。