

報 文

農産物中の残留イミダクロプリドの分析における
市販 ELISA キットの實用性能評価

天 野 昭 子*, 矢 野 秀 治

岐阜県農業技術研究所
〒 501-1152 岐阜市又丸 729

(平成 16 年 12 月 2 日受付, 平成 17 年 4 月 12 日受理)

Evaluation of the Practical Performance of a Commercially Available ELISA Kit in
the Analysis of Residual Imidacloprid in Agricultural Products

Shoko AMANO* and Hideji YANO

Gifu Prefectural Research Institute for Agricultural Sciences, 729, Matamaru, Gifu 501-1152, Japan

A commercially available ELISA kit was evaluated for its practical performance in the analysis of residual imidacloprid in agricultural products. The recovery and repeatability of the recovery test with the shared tomato samples were satisfactory for all six operators. The recovery of imidacloprid from each of various listed agricultural products was satisfactory, ranging between 94.2% and 132.0%: tomato, strawberry, eggplant, green pepper, cucumber, cabbage, radish, carrot, apple, pear and soybean. The end results clearly indicate the ELISA kit is of potential used in the screening and detection of residual imidacloprid in agricultural products. © Pesticide Science Society of Japan

Keywords: immunoassay, ELISA kit, imidacloprid, agricultural products, pesticide residue.

緒 言

輸入農産物や無登録農薬などにおける残留農薬に関する話題が各地で取り上げられ、食の安全が社会問題となっている。農薬取締法の改正により、輸入、販売だけでなく農薬の使用についても規制・罰則が加わるようになった。これと前後し、生産者側でも農薬残留の自主検査を行おうとする動きが各地で見られるようになってきたが、従来の農薬分析ではガスクロマトグラフを始めとする高価な機器や専門的な技術を必要とするため、検査体制を直ちに確立するのは困難であった。これに対し、イムノアッセイ法を利用した残留農薬簡易分析キットが国内外のメーカーから発

売され、その簡便性から現在注目を集めている^{1,2)}。岐阜県においても生産者の自主検査体制確立の要望が行政および生産者現場からあがっており、残留農薬簡易分析キットは大変有望な検査手段として導入されつつある。しかし ELISA キットの農産物検査への利用については、作物体の夾雑物による反応妨害や製品の分析精度等の問題点が指摘されている³⁾。また、すでに利用を始めた現地で測定値に不備が見られた例もあることから、簡易分析キットの現場導入に先立ち、国内で開発、販売され始めた簡易分析キットについて数種の農産物を用いて試験を行い、その精度と実用性について検討したので報告する。

材料および方法

1. 試薬および装置

イミダクロプリド標準品, およびメタノール (メタノー

* To whom correspondence should be addressed.

E-mail: amano-shoko@pref.gifu.lg.jp

©Pesticide Science Society of Japan

ル 300) は和光純薬株式会社の残留農薬分析用を用いた。

簡易分析キット (以下, キットと略す) はスマートアッセイシリーズ (株式会社ホリバ・バイオテクノロジー) のうち, イミダクロプリド用 (測定範囲: 2~100 ppb) を用いた。キットの構成は, 対象成分の抗体を固相化したマイクロプレート (8 ウェル×12 列), 標準試薬 L (2 ppb), 標準試薬 H (100 ppb), 対象成分の酵素標識物試薬, 洗浄試薬 (10 倍濃縮液), 発色試薬, 発色停止試薬である。

吸光度測定には, マイクロプレートリーダー (Multiscan JX・大日本製薬株式会社) を用いた。

2. 供試作物

トマト, イチゴ, ナス, ピーマン, キュウリ, キャベツ, ダイコン, ニンジン, リンゴ, ナシ, およびダイズを用いた。いずれも分析対象となる薬剤が使用されていないことを確認した上で試験に供試した。

3. 抽出および希釈方法

各試料は, 前処理としてミキサーで磨砕均一化した。水分含量の少ないナス, ピーマン, ニンジンは試料 200 g に蒸留水 200 ml を加えてミキサーにかけた。ダイズはミルで粉砕した後, 試料 100 g に蒸留水 100 ml を加えて 1 時間静置した。

前処理を済ませた試料 5 g を 40 ml 容量の蓋付きバイアル瓶に取り, メタノール 25 ml を加えて振とう器で 30 分間振とうした。その後, 定性濾紙 (ADVANTEC, No. 2) で濾過し, 濾液 1 ml に蒸留水 7.5 ml を加えたものを調製試料としてキットに供した。

なお, この操作による試料の希釈率は, 試料毎の水分含量が異なるため一律ではないが, メーカー資料等を参考に, 51 倍希釈されたとみなす。

4. キットの操作方法

標準試薬あるいは調製試料 150 μ l と酵素標識物試薬 150 μ l を混合し, 標準混合液あるいは試料混合液を作成した。抗体プレートのウェルに標準混合液あるいは試料混合液 100 μ l を添加し, 室温で 60 分反応させた。ウェル内の反応液をアスピレーターで除去し, 洗浄液試薬 300 μ l で 3 回洗浄した。発色試薬 100 μ l を加えて室温で 10 分間反応させた後, 反応停止試薬を 100 μ l 添加し, 15 分以内に波長 450 nm における吸光度を測定した。なお抗体プレートへの標準混合液あるいは試料混合液の添加は, 1 混合液につき 2 ウェルとし, 測定値は二重測定の平均値より算出した。

5. 測定値の再現性

イミダクロプリド 0.5 μ g/g を添加したトマト試料 1 検体について, 6 名の作業者にキットで測定させ, 測定値の再

現性を調査した。作業者はキットの原理と操作説明を受けた後直ちに作業に取りかかった。各作業者とも同一検体について 5 g ずつ 3 回秤り取り, 抽出操作の後キットで試料中のイミダクロプリド濃度を測定した。

抗体プレートは, 8 ウェル (ストリップ) ごとに取り外し, 各作業者は 2 本ずつストリップを使用した。試料のウェルへの添加位置は Fig. 1 に示したとおりに統一し, 全員同じ作業となるよう指示した。標準混合液および試料混合液は左右に並んだウェルに順次添加し, 反応させた。ウェルの洗浄はストリップごとに行い, ストリップ 1 を洗浄した後にストリップ 2 の洗浄を行った。発色試薬および発色停止試薬の添加もストリップごとに行い, ストリップ 1 の A から H へ添加した後, ストリップ 2 に添加した。

なお, 各作業者における本試験以前のマイクロプレート型キットの取り扱い経験は 0~3 回であった。

6. 作物由来の夾雑物の測定値への影響

6.1. 作物抽出液の添加

作物抽出液の分析値への影響を見るため, 薬剤無添加のイチゴ, ナス, ピーマンの抽出液をイミダクロプリド標準品に添加し, 反応後の吸光度を調査した。

作物抽出液の作製および標準品への添加方法は以下の通りである。前処理を済ませた各試料 5 g にメタノール 20 ml を加えて振とう, 濾過し, 濾液にメタノールを加えて 29 ml とした。これにメタノールで調製した各濃度のイミダクロプリド標準液を 1 ml 添加し, 標準品添加抽出液とした。添加した標準液の濃度は 0.25, 0.5, 2.5, 5, 25 μ g/ml の 5 濃度である。作製した標準品添加抽出液は前述の希釈操作と同様に蒸留水で希釈してキットに供した。なお標準曲線用のイミダクロプリド標準液は希釈溶媒の濃度が同一となるよう 10% メタノールを用いて希釈調製した。

6.2. 各種農産物における添加回収率

磨砕均一化した各試料に, メタノールで希釈したイミダクロプリド標準品を添加し, 試料中濃度が 0.5 μ g/g となるよう調製した。それぞれの試料について抽出操作を 3 反復

		↓ Strip 1	↓ Strip 2
Well A	→	Standard 2ppb	Standard 2ppb
B		Standard 100ppb	Standard 100ppb
C		Sample 1	Sample 1
D		Sample 2	Sample 2
E		Sample 3	Sample 3
F			
G			
H			

Fig. 1. Position of individual standards and samples in the wells.

行い、得られた調製試料3検体をキットで測定して添加回収率および変動係数を求めた。

結果および考察

1. 測定キットの測定範囲と農薬残留基準値

各農産物におけるイミダクロプリドの登録保留基準値を Table 1 に示した。農産物における残留農薬調査を行う場合、農薬残留基準値あるいは登録保留基準値に基づいて判定を行うが、筆者らは簡易分析キットの現場導入に際し、これら基準値の2分の1の値を判定の目安とした⁴⁾。すなわち、基準値の2分の1以上の値がキットにより検出された場合は、機器分析により確認することを勧めている。そこで、本供試キットについても、その測定範囲(2 ppb から 100 ppb)が各農産物の基準値およびその2分の1の値を含むかどうかを Fig. 2 に示した。基準値等は、本試験の希釈操作に沿って51倍希釈した場合の値を比較した。トマト、ナス、キュウリの基準値1 ppmのグループは、51倍希釈により検量線のほぼ中央で測定することが出来、キャベツ、イチゴ、ピーマンも概ね範囲内に収まっていたが、ダイコン、ニンジン、ダイズの基準値0.1 ppmのグループについては測定範囲の下限値からはずれた。今回の試験では、市販キットの実用性の検討を目的とするため、希釈率や操作方法はメーカーが推奨する方法に統一した。このため、添加回収試験等におけるイミダクロプリド添加量は、検量線の中央で測定されるように、すべての農産物試料で試料あたり0.5 μg/gとした。

2. 測定操作における精度と再現性

作業員6名によるトマトのイミダクロプリド測定結果を Table 2 に示した。作業員別の平均回収率は86.5~119.1%と良好な測定値が得られた。作業員別の変動係数は抽出操作

Table 1. Tolerance level of imidacloprid in individual agricultural products

Plant	Tolerance (ppm)
Tomato	1
Strawberry	3
Eggplant	1
Green pepper	5
Cucumber	1
Cabbage	0.5
Radish	0.1
Carrot	0.1
Apple	1
Pear	1
Soybean	0.1

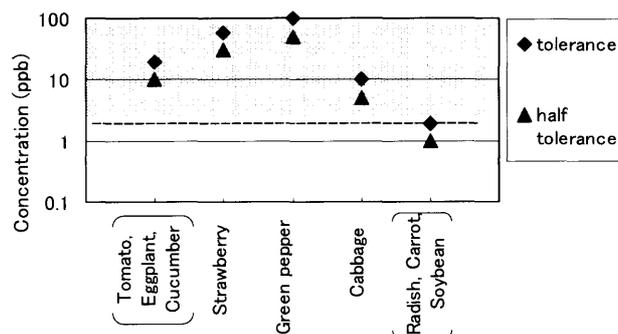


Fig. 2. Relation between tolerance level of imidacloprid and working ranges of the ELISA kit.

.....:working range of ELISA kit (2-100 ppb)

も含めた操作誤差を示すが、1.5~16.7%とやや個人差はあるものの、いずれも20%以内であり許容範囲内であった。

反復試料別の回収率をみると、その変動係数は20%以内に収まっており、対象としたイミダクロプリド測定キットの再現性は安定し、良好であると言える。

次に作業員1と4を例に、二重測定における2つのウェルの吸光度差と、1ストリップ当たりの洗浄および試薬添加にかかる所要時間を Table 3 に示した。なお、ウェルへの添加時間は発色試薬をウェルAからHまで添加した時の所要時間を計測し、ウェルごとにピペットのチップ交換はしていない。作業員1では2つのウェルの吸光度差はほとんど無かったが、作業員4は0.3を超える差が認められた。このウェル間の吸光度差は作業員3および5でも認められたが、いずれも最初に添加したウェル(ストリップ1のA)のほうが後に添加したウェル(ストリップ2のA)より常に高い値を示した。吸光度に差が出る原因として、ウェルへの添加量の誤差や洗浄程度の違い、あるいは反応時間の違い等があげられる。しかし、一列目のストリップに位置するウェルの値が揃って高く、かつその差がほぼ一定であることから、マイクロピペットによる添加量の誤差とは考えにくく、ストリップごとに行う洗浄あるいは反応時間の誤差によると推測される。また、洗浄と添加にかかる時間を比べてみると、いずれの操作も作業員1の方が速く、作業員4は両操作とも作業員1の倍近い時間を要していた。マイクロプレート型タイプのキットではウェルの容量が小さいため、特に初心者ではマイクロピペットでの添加操作等にある程度の訓練が必要と考えられる。しかし今回の6名の作業員は、普段から1~10ml程度のピペット操作に慣れており、初めてELISAキットを操作した人でも添加量や希釈操作に大きな誤差は生じなかったと考えられる。さらに、今回の測定はELISAキット操作研修の一環として行ったため、ウェルへの添加位置や操作手順の確認、使用器具の準備等、一連の作業が滞ることなくスムーズに流れるように援助、指導しながら測定を進めたことも良好な結果に

Table 2. Comparison of different values measured using the ELISA-kit between six operators

Operator	Recovery (%)					Number of times operating kit ^{a)}
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Average	(CV)	
1	101.9	84.2	73.3	86.5	(16.7)	0
2	92.2	106.4	97.6	98.7	(7.3)	1
3	121.2	118.2	118.0	119.1	(1.5)	0
4	125.0	104.9	105.1	111.7	(10.3)	0
5	114.9	110.6	126.8	117.5	(7.1)	3
6	105.4	103.7	100.9	103.3	(2.2)	0
Average	110.1	104.7	103.6			
CV (%)	11.3	10.8	17.8			

^{a)} Before this examination.

All samples used tomato fortified with imidacloprid (0.5 µg/g).

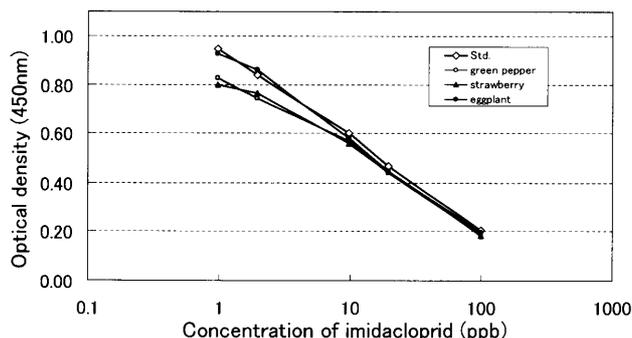
Table 3. Comparison of optical density, time of washing and time of adding the chromogen solution to the well between Operator 1 and Operator 4

		Difference in optical density between strip 1 and strip 2	Time of washing well	Time of adding chromogen solution to well
			(sec/strip)	(sec/strip)
Operator 1	Sample 1	-0.032	100	30
	Sample 2	0.001		
	Sample 3	-0.022		
Operator 4	Sample 1	0.265	210	50
	Sample 2	0.339		
	Sample 3	0.308		

つながったと考えられる。しかし一方で、筆者らによる他社製品の ELISA キットを用いた試験では、初めてキットを操作させた場合、作業員間で測定精度にやや問題が認められた⁴⁾。

3. 抽出液中夾雑物の測定値への影響

イチゴ、ナス、ピーマンの抽出液添加による、イミダクロプリド測定値への影響を Fig. 3 に示した。ナスの抽出液添加での吸光度は標準曲線とほぼ一致しており、測定値への影響は認められなかった。これに対し、イチゴおよびピーマンでは標準曲線からの乖離が見られ、特に低濃度側で吸光度は抑制されていた。このことから、イチゴとピーマンの抽出液はキットの反応に何らかの影響を与えていると言える。またこの両作物は、筆者らがダイアジノン用キット (SDI 社製) を用いて行った試験において回収率は良好でなかった⁵⁾。またイチゴについては、MEP 用キットを用いた

**Fig. 3.** Interference of matrix extracted from three selected agricultural products; green pepper, strawberry and eggplant.

試験において吸光度を抑制することが報告されている⁶⁾。

次に作物別添加回収試験の結果を Table 4 に示した。各作物の回収率は 94.2~132.0% となり、今回供試した 11 作物では特に大きな反応阻害を与えると思われるものは認めら

Table 4. Detectable levels of imidacloprid in agricultural samples after use of the ELISA kit

	Detected concentration ^{a)} ($\mu\text{g/g}$)	Recovery ^{b)} (%)	Coefficient of variation (%)
Tomato	0.51 \pm 0.07	102.8	13.5
Strawberry	0.66 \pm 0.07	132.0	10.5
Eggplant	0.58 \pm 0.01	115.4	2.5
Green pepper	0.58 \pm 0.17	116.4	28.9
Cucumber	0.65 \pm 0.25	129.8	39.2
Cabbage	0.57 \pm 0.10	113.2	16.8
Radish	0.47 \pm 0.02	94.2	3.6
Carrot	0.54 \pm 0.01	107.8	2.4
Apple	0.57 \pm 0.10	113.6	17.2
Pear	0.64 \pm 0.02	128.0	3.4
Soybean	0.55 \pm 0.07	109.6	12.2

^{a)} Values are mean \pm standard deviation ($n=3$).

^{b)} Initially 0.5 $\mu\text{g/g}$ was added to all samples.

れなかった。ただし変動係数を見ると、ピーマンとキュウリでそれぞれ 28.9%、39.2% と大きく、測定値にばらつきが見られた。先の抽出液添加試験で影響の見られなかったナスは、添加回収試験においても測定値は安定しており、抽出操作が加わっても特に問題はなかった。一方、イチゴでの添加回収率は 130% を超えていたが、生産現場での利用目的であるスクリーニングにおいては問題となるほどではないと考えられる。またピーマンでの回収率は 116.4% と良好であった。これは先に述べたとおり、添加量が測定時にキットの測定範囲のほぼ中央となるため、影響が少なかったと推測される。従って、今回の添加量よりも低い濃度について同じ希釈率で測定した場合には、回収率は作物成分の影響により、より大きな値を示す可能性があると考えられる。

以上、今回の試験では希釈倍率の設定を一律に 51 倍で行ったが、供試した農産物中にキット測定値に影響を与えるものはなく、また測定値のばらつきも少なかった。また渡辺ら^{7,8)}によって、HPLC による分析値との相関も高いことがすでに報告されているが、今回の試験により作業員間差も少ないことが確認された。これらのことから、本キットは各種作物におけるイミダクロプリド残留値のスクリーニング検査に用いる上で、大変有望と考えられた。ただし、ELISA キットによる測定値は、作物由来の夾雑物の影響に加え、反応時間などの条件やピペット操作等にも影響を受けるため、これらの要因が重なり合い、測定誤差がより大

きくなる危険性を持っている。従ってキットで測定をする者は、予め操作手順を良く確認しマイクロピペット等の器具の扱いに充分慣れておく必要がある。また、作物によってはその含有成分の影響によりキットでの測定に適さないものもあることから、現場利用の際には対象とする作物が対象とするキットに適しているかどうかを確認した上で利用する必要がある。

今後は反応阻害成分について調査し、除去方法を検討することで利用可能な農産物を広げていくことが必要と考えられる。

要 約

農産物の残留農薬調査における、市販のイミダクロプリド測定キットの実用性について検討した。

6名の作業員による、同一農産物試料としてトマトを用いたイミダクロプリド添加回収実験では、いずれの作業員においても回収率および繰り返し再現精度は良好であった。また、数種農産物（トマト、イチゴ、ナス、ピーマン、キュウリ、キャベツ、ダイコン、ニンジン、リンゴ、ナシおよびダイズ）を用いた添加回収試験では、いずれも回収率は良好であった（94.2~132.0%）。

以上より、イミダクロプリド測定用キットは農産物の残留農薬のスクリーニングに有効な手段であると言える。

謝 辞

本試験を行うにあたり、株式会社ホリバ・バイオテクノロジーより簡易分析キットの提供を、同社の三宅司郎氏には貴重なご助言を頂いた。また、岐阜県の各地域農業改良普及センターの方々には多大なご協力とご助言を頂いた。ここに記して感謝の意を表す。

引 用 文 献

- 1) 橋本良子, 権田優子: 第 27 回農薬残留分析研究会講演要旨, 71–75 (2004).
- 2) 矢吹芳教, 森達摩, 岡田清嗣, 田中寛: 第 27 回農薬残留分析研究会講演要旨, 76–77 (2004).
- 3) 津村ゆかり, 外海泰秀, 中村優美子, 宮田昌弘, 鎌倉和政, 橋端直樹, 岩田邦彦, 伊藤澄夫, 皆葉清美, 沖賢憲, 小玉光男, 伊藤誉志男: 食衛誌 **33**, 458–466 (1992).
- 4) 天野昭子, 平正博: 関西病虫研報 **46**, 57–58 (2004).
- 5) 天野昭子, 小林忠彦: 関西病虫研報 **45**, 107–108 (2003).
- 6) 三宅司郎, 石井康雄: 植物防疫 **54**, 148–152 (2000).
- 7) E. Watanabe, H. Eun, K. Baba, T. Arao, Y. Ishii, S. Endo and M. Ueji: *Anal. Chim. Acta* **512**, 45–51 (2004).
- 8) E. Watanabe, H. Eun, K. Baba, T. Arao, Y. Ishii, S. Endo and M. Ueji: *J. Agric. Food Chem.* **52**, 2756–2762 (2004).