

河川水の農薬分析におけるELISA法の適用

吉田 光方子* 北本 寛明 古武家 善成

Application of ELISA for the Analysis of Pesticide in River Waters

Mihoko YOSHIDA*, Hiroaki KITAMOTO and Yoshinari KOBUKE

*Environmental Safety Division, Hyogo Prefectural Institute of
Public Health and Environmental Sciences, 3-1-27, Yukihira-cho,
Suma-ku, Kobe 654-0037, Japan*

The application of commercially available ELISA kit was studied for the measurements of insecticide Isoxathion and fungicide Isoprothiolane. Non-pretreated river waters were easily analyzed by ELISA method for the both pesticides, however, its sensitivity was low. Therefore, the concentration process with SPE cartridge was introduced as pre-treatment. For Isoprothiolane, there was a significant correlation between ELISA and GC/MS methods with the correlation coefficient of $r=0.979^{**}$, even though the values measured by ELISA were 2.6 to 4.3 times higher than those by GC/MS. On the other hand, for Isoxathion, ELISA method received positive interference because of some concentrated substances. These results suggested that previously consideration for concentration and purification was necessary in the application of ELISA method.

I はじめに

近年、機器分析にかわる新たな分析手法として酵素標識免疫測定法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (以下、ELISA法とする) が実用可能な一手法となり¹⁾、ダイオキシン類の環境測定法の一部に生物検定法²⁾が導入されるなどELISA法が脚光を浴びつつある。ELISA法は安価で簡便な手法であることから、その他のPOPsや環境ホルモン、合成界面活性剤などに加え、農薬測定に関しても、環境測定用のキットが4社から約50農薬成分について販売されている³⁾。

そこで本研究では、ELISA法が環境濃度レベルの農薬に関する有効な分析手法となりうるかを検討するために、

水質要監視項目で指針値が定められている殺虫剤のイソキサチオン及び殺菌剤のイソプロチオランを対象として、市販キットと機器分析 (GC/MS) による測定を行い、結果を比較検討した。

II 方 法

1. 試料及び試薬

ELISAキット及びGC/MSの分析には、夏季に兵庫県内で採取した河川水を使用した。精製水は、Elix純水装置システム (ミリポア社) で製造した。試料の固相抽出には、Sep-Pak PS-2 (以下、PS-2と示す) 及びSep-Pak AC-2 (以下、AC-2と示す) (ともにWaters社) 及びENVI18 (スベルコ社) を使用した。

農薬標準品は、和光純薬工業製を使用し、ELISA分析用にはメタノール、GC/MS分析用にはジクロロメタンで溶解し分析に供した。これらの有機溶媒は残留農薬・PCB試験用を使用した。

安全科学部

* 別刷請求先: 〒654-0037 神戸市須磨区行平町3-1-27
兵庫県立健康環境科学研究センター
安全科学部 吉田 光方子

ELISA分析キットは、殺虫剤のイソキサチオン及び殺菌剤のイソプロチオランとともに、ホリバ・バイオテクノロジー製の測定キットE（環境測定用）を用いた。

イソキサチオンELISA分析における妨害物質除去法の検討のための限外ろ過フィルターは、ミリポア社製のマイクロコン-3, -10, -30を用い、遠心機はトミー精工製の微量高速冷却遠心機を用いた。またpH調整には、塩酸、水酸化カリウム（いずれも特級）を用い、ろ過にはADVANTEC社製のガラス繊維ろ紙GS25（径55mm、厚さ0.22mm）を使用した。

2. 分析手法及び前処理法

2.1 ELISAキット分析

殺虫剤のイソキサチオン及び殺菌剤のイソプロチオランのELISA分析は、キット付属のマニュアルに従い使用した。両分析キットは環境省の実証試験⁴⁾⁵⁾を受け、製品性能の信頼性において、概ね妥当であると評価されている。キットの測定濃度範囲などの特性をTable 1に示す。分析に際しては三重測定を行い、変動係数（C.V）値が10%以下の結果のみを解析に用いた。

Table 1 Properties of the tested kits

	Isoxathion	Isoprothiolane
Measurement range	1~20 μ g/L	6~100 μ g/L
Detection limit	0.24 μ g/L	1.2 μ g/L
Determination limit	0.80 μ g/L	4.0 μ g/L
Cross-reactivity (%)	Isoxathion-oxon(4.5%) Chlorothalonil(<0.1%)	Diazinon(<0.1%) Iprobenfos(<0.1%)
Recovery(%) (Influence of humic acid)	82~95%	90~109%
Recovery rate(%)	111~160%	102~116%

2.2 GC/MS分析

GCはHP5890 II（Agilent Technologies社）、MSはJME-AM150（JEOL社）の装置を使用した。カラムはAgilent社のULTRA2（長さ20m、内径0.2mm、厚さ0.33 μ m）を用いた。詳細は既報⁶⁾に記した。

2.3 試料の前処理法

ELISAキットのマニュアルには試料水の濃縮操作は記載されていないが、河川水中に存在する微量濃度レベルを測定し、機器分析の結果と比較するには感度が不十分であることから、当センターで、農薬分析に使用している前処理法をELISA分析にも用いることにした。

あらかじめジクロロメタン5 mL、メタノール5 mL、精製水5 mLの順でコンディショニングを行ったPS-2及びAC-2を連結後、水質試料500 mLまたは200 mLを流速10 mL/minで通水させた。カートリッジを精製水で洗浄、乾燥後、PS-2、AC-2別々にジクロロメタン5 mLで溶出

を行った。得られた溶出液に窒素を吹きつけジクロロメタンを完全に乾燥させた後、メタノール0.1 mLに再溶解し、精製水0.9 mLを加え、ELISA法の分析に用いた。

GC/MS法では、ジクロロメタン溶出液を窒素吹きつけて約1 mLに濃縮後、フルオランテン-d₁₀を内部標準として100 ng添加し、分析に供した。詳細は既報⁷⁾に記した。

2.4 試料の前処理法の検討

前処理法として、固相抽出法では、PS-2とAC-2を連結した固相カートリッジ及びENVI18、液々抽出法ではジクロロメタンによる振とう抽出の3手法を検討した。

固相抽出法では、精製水500 mLを前述の前処理法で処理後、溶出液に農薬標準溶液をイソキサチオン3 ng/mL、イソプロチオラン15 ng/mLとなるように添加した試料、及び無添加の試料をそれぞれELISA法に供した。

液々抽出法では、分液ロートに精製水500 mLを入れ塩化ナトリウム15 gを溶解後、ジクロロメタン100 mLを入れ、10分振とうした後ジクロロメタンを分取した。同様の操作を再度繰り返した後、分取したジクロロメタンを先のジクロロメタンにあわせ、窒素を吹きつけてジクロロメタンを完全に乾燥させた。その後、メタノール0.1 mLに再溶解後、精製水0.9 mLを加えた溶液について、固相抽出と同様に標準溶液添加及び無添加の試料を作成しELISA法に供した。

3. イソキサチオンELISA分析における妨害物質除去法の検討

イソキサチオンELISA分析において、高濃縮の河川水試料で擬陽性がみられたことから、妨害物質除去のために以下2法を検討した。

3.1 限外ろ過膜による精製

II-2.3で得られたELISA分析用試料500 μ Lをマイクロコン-3, -10, -30に分取し、微量高速冷却遠心機(12,000 rpm, 30分間)で限外ろ過⁸⁾⁹⁾を行い、ろ過液をELISA法に供した。それぞれの限外ろ過膜の分画分子量は、3,000, 10,000, 30,000である¹⁰⁾。

3.2 pH調整及びガラス繊維ろ紙による精製

河川水500 mLを1 N塩酸で酸性（約pH 3）に下げ、ガラス繊維ろ紙GS25でろ過し、ろ液を1 N水酸化カリウムで中性にした¹¹⁾¹²⁾。その後、II-2.3の前処理を行いELISA法に供した。

III 結果および考察

1. ELISA法における前処理法の検討

試料の前処理法として、PS-2とAC-2を連結した固相

カートリッジ, ENVI18, 及びジクロロメタンによる液々抽出の3法を検討した. その結果をFig. 1に示す.

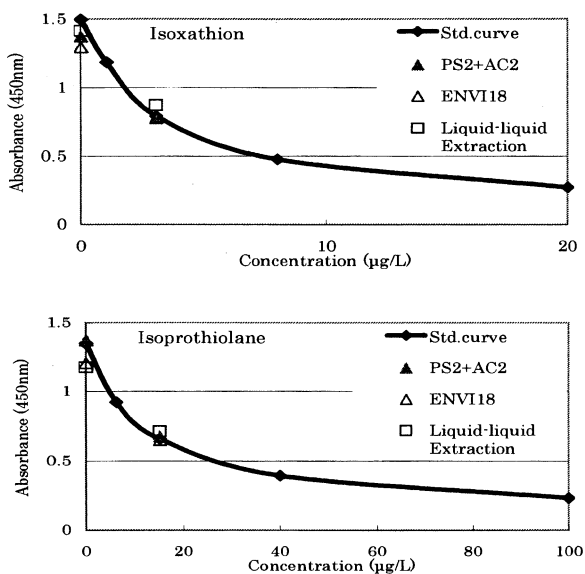


Fig.1 Comparison of the pretreatment techniques

いずれの前処理法においてもイソキサチオン, イソプロチオランともに, 標準検量線と標準農薬添加試料の吸光度は概ね一致し, 前処理操作が原因となる影響はみられなかった.

この結果から, 前処理法として, 従来よりGC/MS分析法で用いているPS-2とAC-2を連結した固相カートリッジ法を使用することにした.

2. 河川水への標準液添加試験

河川原水, 濃縮した河川水それぞれに対象農薬を添加し, ELISA法の分析を行った. 河川水は, GC/MS分析で対象農薬が不検出と確認されたものを使用した. また, 対象農薬の添加濃度は, 各ELISA分析キットの説明書に記載されている検量線作成濃度と同様とした. 結果をFig. 2に示す.

河川原水の場合は, 2種の農薬とも, 検量線(図中太実線)と標準物質を添加した試料(図中細実線)の吸光度は概ね一致しており, 無濃縮の河川水では妨害物質の影響が表れないことが確認された.

一方, 濃縮した河川水の場合は, 2種の農薬で異なる結果となった. イソプロチオランでは, 検量線(図中太実線)と標準物質を添加した試料(図中点線)の吸光度は概ね一致していたのに対し, イソキサチオンにおいては, 標準物質を添加した試料(図中点線)の吸光度は, 検量線(図中太実線)の吸光度と大きく乖離しており, 濃縮した河川水試料では擬陽性になる可能性が高いことが推察された. また, 検量線からの乖離の程度は, 高倍

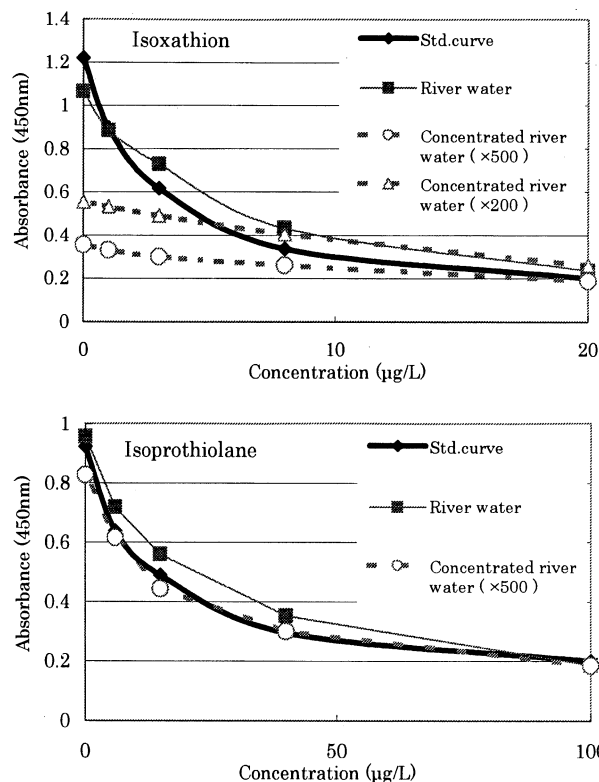


Fig.2 Comparison of standard curve with standard addition into river water and concentrated river water

率濃縮するほど大きくなることが確認された.

この結果から, イソプロチオランでは河川水濃縮によるELISA法での定量が可能であるが, イソキサチオンでは定量が困難であると推察された.

3. イソキサチオン分析の精製に関する検討

2の結果から, イソキサチオンのELISA分析では, 河川水の濃縮により何らかの含有物質が正の妨害を生じさせ, 擬陽性に傾く要因になると推察された. そこで, II-3. に記述した「限外ろ過」及び「pH調整後のガラス

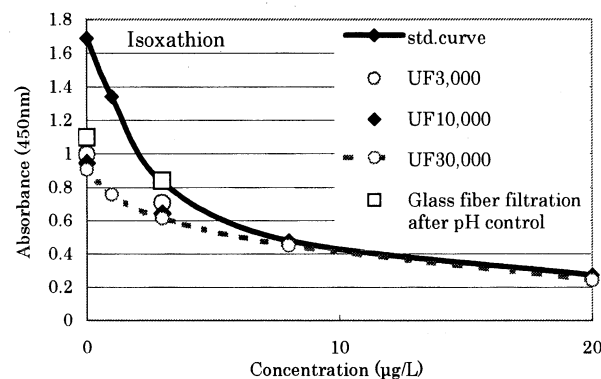


Fig.3 Comparison of purification method for Isoxathion

* UF; Ultrafiltration molecular weight limit

繊維ろ紙によるろ過」の2種類の精製法により、正の妨害を生じさせる原因物質の除去が可能であるか検討を行った。結果をFig. 3に示す。

「限外ろ過」では、分画分子量が30,000、10,000、3,000と小さくなるにつれ擬陽性への影響は多少低減したが、大きな改善はみられず、また「pH調整後のガラス繊維ろ紙によるろ過」でも同様に大きな改善がみられなかった。したがって、原因物質は、いずれの精製法においても十分除去されない物質と判断された。

4. 河川試料におけるELISA法とGC/MS法との分析結果の比較

河川試料8サンプルについて、ELISA法とGC/MS法で定量を行った。いずれも、河水を500倍濃縮して得られた測定値を濃縮倍率で割り戻し、河水水中濃度として示した。分析結果及び定量下限値をTable 2に示す。

Table 2 Concentrations of Isoxathion and Isoprothiolane with ELISA and GC/MS methods

River water sample No.	Isoxathion		Isoprothiolane	
	ELISA method	GC/MS method	ELISA method	GC/MS method
1	0.0085	N.D.	0.025	0.0097
2	0.0095	N.D.	0.10	0.024
3	0.010	N.D.	0.064	0.017
4	0.010	N.D.	0.039	0.0099
5	0.0091	N.D.	0.040	0.011
6	0.0071	N.D.	0.040	0.012
7	0.019	N.D.	0.037	0.013
8	0.014	N.D.	0.052	0.014
Blank	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Detection Limit	0.002	0.003	0.008	0.004

N.D.; not detected

4.1 イソキサチオンの測定結果

イソキサチオンは、ELISA法では、0.0071~0.019 $\mu\text{g/L}$ の範囲ですべての河水から検出されたのに対し、GC/MS法ではすべて不検出 (<0.003 $\mu\text{g/L}$) となり、2つの分析法での結果は合致しなかった。ELISA法でイソキサチオンと交差反応性があるとされているイソキサチオンのオキソン体⁴⁾も、GC/MS法では不検出であることが確認された。この結果及び前述2. 河水への添加試験結果から、濃縮河水には、ELISA法で擬陽性の原因となる妨害物質が含まれていると推察される。

4.2 イソプロチオランの測定結果

イソプロチオランの濃度は、ELISA法では0.025~0.10 $\mu\text{g/L}$ 、GC/MS法では0.009~0.024 $\mu\text{g/L}$ となり、いずれの分析法においてもすべての河水から検出された。GC/MS法での濃度に対するELISA法での濃度の関係は

Fig. 4に示す。ELISA法での測定値は、GC/MS法の測定値の2.6~4.3倍ではあるが、 $r=0.979^{**}$ で高度に有意な正の相関関係が得られた。

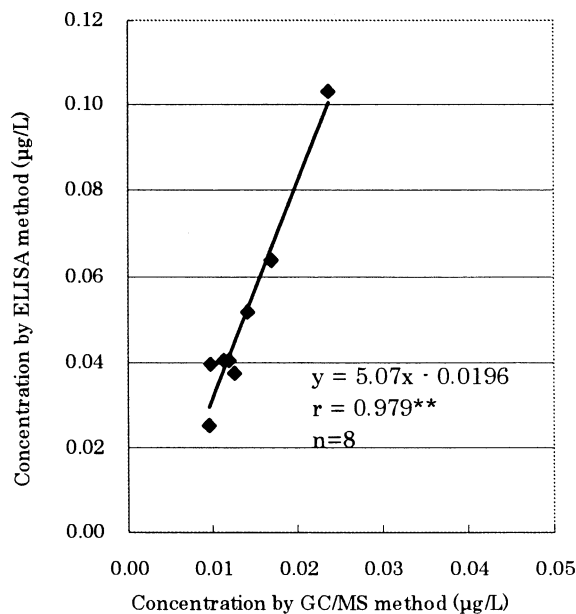


Fig. 4 Concentration of Isoprothiolane with ELISA and GC/MS

5. ELISA法の環境試料への適用可能性

本結果から、イソキサチオンについては、擬陽性の原因となる妨害物質の除去法を確立することができなかった。機器分析と同程度の感度での環境試料測定を、濃縮法導入で実現することは困難であると考えられる。この原因としては、従来から指摘されているように、フミン酸やフルボ酸に代表されるフミン質の妨害が考えられる¹³⁾。フミン質は疎水性を有することから、一般的に非イオン性樹脂に吸着される¹⁰⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。この性質から、本研究において用いた河水の濃縮方法は、対象農薬のみならずフミン質も同様に濃縮している可能性が大きいと推察される。鑑迫¹³⁾は、フミン質の一成分であるフミン酸の影響をフミン酸ナトリウム添加試験において検討しており、妨害の程度はフミン酸量に依存すると報告している。本研究のイソキサチオンのELISA分析の結果においても、III-2で論述したように、標準物質を添加した試料の吸光度は、検量線の吸光度と大きく乖離し、その乖離の程度は、濃縮倍率に依存していることが確認された。

感度向上のために実施した濃縮操作が、妨害成分となる可能性の高いフミン質も同時に濃縮したと推察される。

また、筒木によれば、フミン質の一成分であるフルボ酸は、疎水性化合物に親和性を持つ樹脂処理により平均分子量が減少するとされている¹⁶⁾。すなわち、樹脂で処理する前のフルボ酸は、主に多糖類からなる平均分子量

2～3万の高分子成分を含むが、処理後は平均分子量が数千～1万程度に著しく減少する。一般的にフルボ酸の構造は不均一であり、水中のフルボ酸の分子量は500～2000とも800とも言われており¹⁰⁾、正確な分子量は定められていない。

Ⅲ-3.において、分画分子量3,000, 10,000, 30,000の3種類の限外ろ過膜では妨害物質を十分除去できない結果が得られた。この結果は、高分子のフミン質は多少除去されるものの、河川水に含有されるフミン質は90%以上が分子量の小さいフルボ酸から構成されている¹¹⁾ことから、限外ろ過では除去しきれず、試料中に妨害物質として残存したと推察される。

一方、イソプロチオランに関しては、ELISA法での測定値はGC/MS法の測定値と相関が得られたが、定量値自体には2.6～4.3倍の差が認められた。しかし、農産物でのELISA試験において、妨害物の無除去試料では3倍を超える値が得られた報告¹²⁾や、一般的にELISA法では統計学上の擬陽性が多いとの報告¹³⁾がある。したがって、イソプロチオランの分析に関しては、GC/MS法の定量値と概ね同レベルであったことから、環境試料への適用が可能であると推察される。

本結果は、市販のELISAキットを環境試料に適用する際には、濃縮操作や精製過程の事前検討が重要であることをあらためて示している。

IV 要 旨

本報において、殺虫剤のイソキサチオン及び殺菌剤のイソプロチオランの市販キットとGC/MSでの機器分析による測定結果の比較を行った。

固相抽出による濃縮操作を前処理法として用い、河川水を500倍濃縮してELISA法に適用したところ、殺虫剤のイソキサチオンに関しては擬陽性になることが確認された。この原因は明確ではないが、河川水中に存在する妨害物質が一因であると推察された。妨害物質の除去に分画分子量3,000, 10,000, 30,000の限外ろ過及びpH調整後のガラス繊維ろ紙によるろ過を行ったが、いずれの精製方法でも擬陽性に傾く状況は改善されず、環境試料への適用は困難であると考えられた。

殺菌剤のイソプロチオランでは、ELISA法での測定値は、GC/MS法の測定値と相関が得られた。ELISA法の定量値はGC/MS法と比較し、2.6～4.3倍高濃度であったが、一般的なELISA法の結果¹³⁾と同様であり、本研究の前処理法を使用したELISA法が、環境試料の分析に適用可能だと示唆された。

本研究は、環境省の「平成17年度化学物質環境実態調査における農薬調査-同一試料を用いた簡易分析手法(ELISA法)と機器分析手法による同一施設内での分析調査-」の委託事業の一環として行われた結果をまとめたものである。

文 献

- 1) 古武家善成：化学物質環境モニタリングの新展開 - 環境省ELISA実証事業の意義 -。環境技術, 35, 644-650 (2006)
- 2) 環境省水・大気環境局総務課ダイオキシン対策室：ダイオキシンに係る生物検定法マニュアル(排出ガス, ばいじん及び燃え殻), (2006)
- 3) 宮本信一, 有菌幸司：ELISAによる環境汚染物質の測定。水環境学会誌, 29, 2-8 (2006)
- 4) 山口県：環境省技術実証事業 化学物質に関する簡易モニタリング技術実証試験結果報告(イソキサチオン), (2005)
- 5) 山口県：環境省技術実証事業 化学物質に関する簡易モニタリング技術実証試験結果報告(イソプロチオラン), (2005)
- 6) 吉田光方子, 鄭小萍, 藤森一男：加古川下流域における農薬の濃度変動。兵庫県立健康環境科学研究所年報, 2, 162-167 (2003)
- 7) 吉田光方子, 北本寛明, 古武家善成：ELISA法を用いた河川中イソプロチオラン, イソキサチオンの分析。第15回環境化学討論会講演要旨集, 572-573 (2006)
- 8) 成田伊都美, 森谷和幸, 小林由美, 佐藤賢一, 中村幸二：農作物におけるイムノアッセイによる出荷前の残留農薬分析。第15回環境化学討論会講演要旨集, 742-743 (2006)
- 9) 畠山えり子, 阿久津千寿子, 梶田弘子, 高橋悟：ELISA法による農作物中の残留農薬分析(イミダクロプリド)。第15回環境化学討論会講演要旨集, 744-745 (2006)
- 10) 米林甲陽：生態系における腐食生成と脂肪族成分の変動。土壌の物理性, 65, 35-41 (1992)
- 11) 筒木潔：フミン物質とその水環境へのかかわり。水環境学会誌, 18, 252-256 (1995)
- 12) 米林甲陽：フミン物質の分離とそのキャラクターゼーション。水環境学会誌, 18, 257-260 (1995)
- 13) 鎌迫典久：環境のバイオモニタリング-免疫化学測定法の環境への適用-環境バイオモニタリングの実際-免疫化学測定法を中心として-。環境技術, 35, No.9, 639-643 (2006)

- 14) Carter, C.W. and Suffet, I.H. : Binding of DDT to dissolved humic materials, Environ. Sci. Technol., **16**, 735-740 (1982)
- 15) Chiou, C.T., Kile, D.E., Brinton, T.I., Malcolm, R.L., Leenheer, J.A. and MacCarthy, P. : A comparison of water solubility enhancements of organic solutes by aquatic humic materials and commercial humic acids. Environ. Sci. Technol., **21**, 1231-1234 (1987)
- 16) Thurmann, E.M., Wershaw, R.L., Malcolm, R.L. and Pinckney, D.J. : Molecular size of aquatic humic substances, Org. Geochem., **4**, 27-35 (1982)
- 17) 天野昭子, 須賀しのぶ, 澤野定憲 : ELISA 法を用いた残留農薬簡易分析におけるハウレンソウの測定妨害について. 日本農薬学会大会講演要旨集, **32**, 99 (2007)