

# 博士学位論文内容の要旨

学位申請者氏名	平川 由紀
論文題目	Development of the Assay Methods for Pesticides by Immunological Technique (免疫学的手法による農薬定量法の開発)
論文審査担当者	主 査 成田 宏史 (印) 審査委員 川添 禎浩 (印) 審査委員 八田 一 (印)

近年、食品への残留農薬問題が多発したことを受けて、食品衛生法に基づき全ての農薬について各食品の残留基準を設定するポジティブリスト制度が施行された。これらの農薬測定の新定法としては、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)–質量分析器 (MS) とガスクロマトグラフィー (GC) –MS による一斉分析法が導入されているが、高価な装置と高度な技術が必要なため、食の流通の現場、食品事業者の活用は困難であった。

一方、農薬測定に免疫学的手法 (直接競合 ELISA) が導入され、迅速・簡便・安価な手法として、食品の生産・流通現場において用いられるようになってきている。本研究は、検出頻度が高い殺菌剤クロロタロニルとボスカリドを対象に、これらに特異的なモノクローナル抗体を作製するとともに、直接競合 ELISA、さらには表面プラズモン共鳴 (SPR) による分子間相互作用測定装置 (Biacore T200) を利用したイムノセンサーを構築し、多検体同時測定および自動化を試みたものである。

## 第1章 クロロタロニルに対する直接競合 ELISA の開発

植物カビ病用殺菌剤として汎用されているクロロタロニルに対するモノクローナル抗体 TPN9A を作製し、これを用いた直接競合 ELISA を確立した。本法の測定範囲は、0.10-6.0 ng/mL で、各種の農産物に対する残留基準値 (0.5-50 ng/g) を測定可能であった。また、他の農薬とは、フサライドと 22 %、キントーゼンと 17 % の交差反応性を示すものの、既存の ELISA と比較して高い特異性を示した。野菜を用いた添加回収試験では、回収率が 97.1~125 %、HPLC との相関性も相関係数が 0.98~0.99 と良好で、実用性の高い直接競合 ELISA 開発できた。

## 第2章 表面プラズモン共鳴 (SPR) を用いたクロロタロニルに対するイムノセンサーの開発

次に、上述の TPN9A を用いた SPR-イムノセンサーをめざしたところ、感度は間接競合 ELISA と比較して 10 倍低かったが、測定範囲は 8.0-44 ng/mL と残留基準値の測定には十分で、測定時間が 3 分と短く測定精度も ELISA より高いものの開発に成功した。野菜を用いた添加回収試験では、回収率が 90-118 %、HPLC との相関性も相関係数が 1.00 と良好だった。なお、チップからの抗体の解離に 2 段階法を導入することにより、200 回の利用を可能にした。本法は、野菜中の残留農薬測定方法として SPR を用いた世界初の成功例である。

## 第3章 直接競合 ELISA および表面プラズモン共鳴を用いたイムノセンサーによるボスカリ

## ドの測定

灰色かび病、菌核病に高い効果がある殺菌剤ボスカリドに対するモノクローナル抗体 BSC7 を作製し、これを用いて直接競合 ELISA と SPR-イムノセンサーを開発した。どちらも残留基準値以下で測定可能であり、野菜を用いた添加回収試験では、前者の回収率が 100-124 %、後者が 85-109 %、トマト実試料の測定においても HPLC と相関係数が 0.97 と 0.95 と良好であり、実用的な免疫測定法を開発できた。

## 第 4 章 表面プラズモン共鳴を用いたイムノセンサーによるボスカリド、クロチアニジン、ニテンピラムの同時分析

クロチアニジンとニテンピラムは、現在最も汎用されているネオニコチノイド系に属す殺虫剤である。殺菌剤ボスカリドとは同時期に施用されることがあるため、3 チャンネルを併行測定可能な SPR-イムノセンサーの特徴を生かして両者の同時測定方法の開発を試みた。まず、それぞれの農薬の測定に対して他の農薬は妨害しないことを確認した。さらに、野菜を用いた添加回収試験では 3 農薬共に 72~105 %の回収率、直接競合 ELISA との相関性も 0.98-1.00 と良好だった。本研究の成功により、社会ニーズの高い同時多成分測定用 SPR-イムノセンサーの開発への第一歩が踏み出されたことを意味している。

## まとめ

残留農薬測定のための免疫測定法として直接競合 ELISA、SPR-イムノセンサーを開発した。直接競合 ELISA は、市販キットと同様に出荷前検査などに使用できると考えられる。また、SPR-イムノセンサーの確立は、今後同時多成分測定へと進めることによって、新しい農薬残留分析システムの構築を期待させるものである。