

環境技術実証モデル事業
化学物質に関する簡易モニタリング技術分野

化学物質に関する簡易モニタリング技術 実証試験結果報告書

環境技術開発者	株式会社エンバイオテック・ラボラトリーズ
技術・製品の名称	技術:ELISA法(酵素免疫測定法) 製品の名称:PCB EIA System

平成17年3月

兵 庫 県

はじめに

環境技術実証モデル事業は、既に適用可能な段階にありながら、環境保全効果等についての客観的な評価が行われていないために普及が進んでいない先進的環境技術について、その環境保全効果等を第三者が客観的に実証する事業をモデル的に実施することにより、環境技術実証の手法・体制の確立を図るとともに、環境技術の普及を促進し、環境保全と環境産業の発展に資することを目的とするものである。

本実証試験は、平成 16 年 8 月 31 日 環境省総合環境政策局が策定した実証試験要領に基づいて選定された実証対象技術について、同実証試験要領に準拠して実証試験を実施することで、製品性能の信頼性等を客観的に実証するものである。

（実証項目）

- 製品性能の信頼性
- 一般環境モニタリングでの実用性
- 製品操作等の簡便性

本中間報告書は、実証試験計画書に基づき実施した試験結果について、現在までに得られた概要を取りまとめたものである。

（実証機関）

兵庫県立健康環境科学研究所

所長 吉村 幸男

製品名称	PCB EIA System
環境技術開発者	(株)エンバイオテック・ラボラトリーズ
実証機関	兵庫県
対象物質	PCB (PCB IUPAC #118)
実証試験の実施期間	平成 17 年 2 月 9 日～平成 17 年 3 月 11 日

1．実証対象技術の概要

この実証対象製品は、ポリ塩化ビフェニル(PCB) IUPAC #118 に対する特異的なモノクローナル抗体を応用した、環境および生物中(対象環境媒体：底質，生物)の PCB 測定 ELISA キットである。

ELISA の原理は、競合反応(PCB 濃度が高い試料では吸光度が低く、PCB 濃度が低い試料では吸光度が高い)で、マイクロプレート(96 ウェル)を使用したキットである。

2．実証試験の概要

実証試験項目の内容は、次のとおりである。

項 目	内 容
1．基本的な性能	
(1)測定範囲	市販標準品で調製した指定濃度系列の試験用試料(濃度既知)を用いた ELISA 測定値の変動等に基づき、数値的な設定の妥当性を実証する。
(2)検出下限及び定量下限	市販標準品で調製した指定濃度系列の試験用試料(濃度既知)を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の標準偏差に基づき、数値的な設定の妥当性を実証する。
(3)繰返し再現性	市販標準品で調製した指定濃度系列の中央付近の試験用試料(濃度既知)を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(4)日間再現性	同一測定者が市販標準品で調製した試験用試料(濃度既知)を用いて異なる条件(日付)での同一操作による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(5)期間再現性	市販標準品で調製した試験用試料(濃度既知)を用いて製造後一定期間経過した製品の操作による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(6)プレート間再現性	市販標準品で調製した試験用試料(濃度既知)を用いて異なるロットや異なるプレート間での ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(7)交差反応性	市販標準物質及び類似物質を用い調製した指定濃度系列の試験用試料(濃度既知)を用いて類似物質別の ELISA 測定値の相違等に基づき、交差反応性を実証する。

2. 実用的な性能	
(1)回収特性	環境試料を模擬し市販標準品で指定濃度範囲の中央付近の1濃度に混合調製した試験用試料(濃度既知)を用いたELISA測定値の比較に基づき、回収特性を実証する。
(2)測定精度	複数の河川地点から得られた河川水の環境試料(濃度未知)を用いたELISA測定値の変動や操作手順・操作方法の特徴等に基づき、測定精度、前処理妥当性、操作簡便性等による環境試料への適用性を実証する。

3. 実証対象製品のデータ

環境技術開発者より提出された実証対象製品のデータは、次のとおりである。

項目	記入欄
製品名	PCB EIA System
型番	RPN5949
販売・製造元	《販売》アマシャムバイオサイエンス(株) 《製造》(株)エンバイオテック・ラボラトリーズ
重量(キット一式, g)	約500g
価格(円)	98,000円
分析対象物質	PCB
対象環境媒体	水質・底質・生物・その他(土壌)
利用用途	食品・土壌中のPCBスクリーニング
標準試薬・種類	4-methoxy-3,3',4-trichlorobiphenyl 付属(調整済/調整要)
操作環境(室温)	15 ~ 35 (室温)
製品保管条件	2~8 (冷蔵保存)
製品保証期間	製造後6ヶ月間
同時測定数(最多)	42試料(2重測定)
測定時間	1.5時間(前処理時間除く)

注) 実証対象製品の基本的な性能及び実用的な性能は、次表の製品データのとおり。

4. 実証試験結果の概要

項目	結果概要	
実証機関	兵庫県	
製品名称	PCB EIA System	
環境技術開発者	(株)エンバイオテック・ラボラトリーズ	
対象物質	PCB (PCB IUPAC #118)	
実証試験計画書の策定	平成 16 年 12 月	
実証試験の実施期間	平成 17 年 2 月 9 日～平成 17 年 3 月 11 日	
1) 基本的な性能	実験データ	【参考：製品データ】
測定範囲	10～250 μ g/L 相対値:83.3～119.1%, CV:2.4～8.3%	6.5～250 μ g/L
検出下限及び定量下限	調製濃度 10 μ g/L の SD から求めた 検出下限 (3SD) : 3.5 μ g/L 定量下限 (10SD) : 11.5 μ g/L	検出下限 6.5 μ g/L 定量下限 6.5 μ g/L
繰返し再現性	調製濃度 25 μ g/L での 標準偏差:1.0 μ g/L, CV : 2.8%	標準偏差 1.7～5.0 変動係数 2.1～8.9% (同一ロット, n=8, 3 濃度測定)
日間再現性	調製濃度 10～250 μ g/L (3 日間)における CV 8.0～21.4%	標準偏差 2.9～9.7 変動係数 11.6～16.5% (同一ロット, 6 日間 3 濃度測定)
期間再現性	調製濃度 10～250 μ g/L で 1 ヶ月を隔てて 2 回測定した時の CV : 0 ヶ月 : 0.7～14.1% 1 ヶ月後 : 6.0～23.1%	標準偏差 3.2～10.7 変動係数 11.6～12.5% (同一ロット, 製造日より 0 ヶ月, 3 ヶ月, 6 ヶ月後に 2 濃度測定)
プレート間再現性	測定濃度 10～250 μ g/L における CV 24.4～40.8% (同一ロット 2, 異ロット 1)	標準偏差 1.9～3.6 変動係数 7.2～9.1% (同一ロット, 2 濃度測定)
交差反応性	交差反応率: PCB #77 19.7%, PCB #105 3.7%, HBB #153 < 0.5%	交差反応率: 0.88～15.2% (PCB#28,#31,#66,#70,#105,#110)
2) 実用的な性能		
回収特性*	妨害物質: フミン酸ナトリウム 0～50mg/L 反応影響率 187～252% (25 μ g/L : DMSO 溶液)	回収率 78.4～112% (魚前処理後試料)
測定精度等	河川水試料の測定 ELISA 法 定量下限値未満 機器分析 0.0002～0.015 μ g/L 共に水質環境基準値未満 ELISA 分析用の試料水については、環境 基準値を判定できるよう、1000 倍濃縮 処理を行なった。	機器分析との相関 生物(魚)試料 R ² =0.96, n=20 土壌試料 (高濃度試料) R ² =0.99 (低濃度試料) R ² =0.94

備 考	<p>* (2)- について、キット反応には試料の濃縮操作及び DMSO への転溶操作が必要なため、これに伴う河川水中妨害物質の影響が、添加するフミン酸にプラスされることが懸念された。従って試料前処理操作は行わず、フミン酸ナトリウムのみ反応への影響率の確認を行なった。</p> <p>市販標準品 1,000μg/L では 吸光値が低すぎ濃度換算されない場合があった。</p>
結果の検討と考察	
<p>1) 製品性能の信頼性</p> <p>実証試験で実施した基本性能 7 項目の全ての結果から、10 ~ 250μg/L の濃度範囲においては、ほぼ妥当な製品性能の信頼性を確認した。</p> <p>2) 一般環境モニタリングでの実用性</p> <p>一般の河川水中 PCB 濃度は低値であることから、適切な前処理を行えば実用化が可能である。</p> <p>3) 製品操作等の簡便性</p> <p>一般環境モニタリングでの使用を想定した場合、試料の前処理時間を除いて、2 時間で測定結果が得られた。また、同時に約 25 試料 (3 重測定) の測定が可能である。</p> <p>なお、本試験での GC/MS 測定では、3 試料 (3 重測定) の測定に約 3 日が必要である。</p>	

目次

1 実証試験の概要.....	1
1.1 実証対象製品のデータ.....	1
1.2 実証試験結果.....	2
(1) 基本的な性能.....	2
(2) 実用的な性能.....	3
2 実証対象技術及び実証対象製品の特性と説明.....	5
2.1 実証申請者.....	5
2.2 実証対象技術の原理.....	5
2.3 実証対象製品のデータ（性能，製品製造者，製品番号等）.....	5
3 実証試験実施体制.....	6
3.1 実証試験申請者.....	6
3.2 実証試験実施者.....	6
3.3 実証試験実施場所.....	6
(1) ELISA 法.....	6
(2) 機器分析法.....	6
3.4 実証試験実施期間.....	6
4 試験方法.....	7
4.1 共通して行う試験操作.....	7
(1) 製品の操作.....	7
(2) 検量線作成用標準溶液の調整.....	7
(3) 吸光値の測定.....	7
(4) 検量線の作成.....	7
(5) 実測濃度の算出.....	7
4.2 基本的な性能.....	8
(1) 測定範囲.....	8
(2) 検出下限値および定量下限値.....	9
(3) 繰返し再現性.....	10

(4) 日間再現性.....	11
(5) 期間再現性.....	12
(6) プレート間再現性.....	13
(7) 交差反応性.....	14
4.3 実用的な性能.....	15
(1) 回収特性.....	15
(2) 測定精度等.....	16
5 試験結果.....	17
5.1 基本的な性能.....	17
(1) 測定範囲.....	17
(2) 検出下限値および定量下限.....	19
(3) 繰返し再現性.....	21
(4) 日間再現性.....	23
(5) 期間再現性.....	27
(6) プレート間再現性.....	30
(7) 交差反応性.....	34
(追加試験) HBB #153 追加試験.....	36
5.2 実用的な性能.....	39
(1) 回収特性.....	39
(2) 測定精度.....	42
6 実証試験結果の検討と考察.....	45
(1) 製品性能の信頼性.....	45
(2) 一般環境モニタリングでの実用性.....	45
(3) 製品操作等の簡便性.....	45

1. 実証試験の概要

1.1 実証対象製品のデータ

環境技術開発者より提出された実証対象製品のデータは、下表に示すとおりである。

表1 実証対象製品のデータ

項目	記入欄
技術・製品の名称	PCB EIA System
実証申請者	株式会社 エンバイオテック・ラボラトリーズ
実証試験実施者	兵庫県立健康環境科学研究センター
実証試験実施場所	〒654-0037 神戸市須磨区行平町 3-1-27
実証試験実施期間	平成 17 年 2 月 9 日 ~ 平成 17 年 3 月 11 日
製品名	PCB EIA System
型番	《アマシャムバイオサイエンス(株)商品コード》
販売・製造元	《販売》アマシャムバイオサイエンス(株) 《製造》(株)エンバイオテック・ラボラトリーズ
重量(g)	約 500g
価格(円)	98,000 円
分析対象物質	PCB (PCB IUPAC #118)
対象環境媒体	水質・底質 <input checked="" type="checkbox"/> 生物 <input checked="" type="checkbox"/> その他() 底質試料は抽出操作が必要
利用用途	食品・土壌中の PCB スクリーニング
標準試薬・種類	4-methoxy-3,3',4-trichlorobiphenyl 付属(調製済/ <input checked="" type="checkbox"/> 調製要)
操作環境(室温)	20 ~ 28
製品保管条件	2 ~ 8
製品保証期間	製造後 6 ヶ月間
同時測定数(最多)	42 試料(2 重測定)
全体測定時間	1.5 時間(前処理時間除く)

1.2 実証試験結果

環境技術開発者が実証申請書に示した基本的な性能に関するデータと実証試験結果は、概ね一致した。実用的な性能については、適切な前処理方法との組み合わせにより、実用化可能と思われる。

(1) 基本的な性能

測定範囲

申請データ：6.5～250 $\mu\text{g/L}$

実証データ：10～250 $\mu\text{g/L}$

相対値：83.3～119.1 %、CV：2.4～8.3 %

検出下限及び定量下限

申請データ：検出下限 6.5 $\mu\text{g/L}$ ，定量下限 6.5 $\mu\text{g/L}$

実証データ：検出下限(3SD) 3.5 $\mu\text{g/L}$ ，定量下限(10SD) 11.5 $\mu\text{g/L}$

繰返し再現性

申請データ：標準偏差 1.7～5.0、変動係数 2.1～8.9%

(同一ロットのキットを用いて、n=8 にて 3 濃度の試料測定)

実証データ：測定濃度 25 $\mu\text{g/L}$ における

標準偏差 1.0 $\mu\text{g/L}$ 、変動係数 2.8 %

日間再現性

申請データ：標準偏差 2.9～9.7、変動係数 11.6～16.5%

(同一ロットのキットを用いて、6 日間 3 濃度の試料測定)

実証データ：測定濃度 10～250 $\mu\text{g/L}$ における変動係数 8.0～21.4 %

期間再現性

申請データ：標準偏差 3.2～10.7、変動係数 11.6～12.5%

(同一ロットのキットを用いて、製造日より0ヶ月、3ヶ月、6ヶ月後に2濃度の試料測定)

実証データ：調製濃度 10～250 µg/L で1ヶ月を隔てた2回の測定による値

0ヶ月：標準偏差 2.5～8.3 µg/L、変動係数 0.7～14.1 %

1ヶ月後：標準偏差 2.0～71.6 µg/L、変動係数 6.0～23.1 %

プレート間再現性

申請データ：標準偏差 1.9～3.6、変動係数 7.2～9.1%

(同一ロットのキットを用いて、2濃度の試料測定)

実証データ：測定濃度 10～250 µg/L における変動係数 24.4～40.8%

(市販標準品 1,000 µg/L の測定については判定不能となったものがあつた為、示した変動係数の範囲には含まない。)

交差反応性

申請データ：交差率 0.88～15.2 % (PCB #28, #31, #66, #70, #105, #110)

実証データ：PCB #77 19.7 %

PCB #105 3.7 %

HBB #153 <0.5 %

(2) 実用的な性能

回収特性

申請データ：回収率 78.4～112% (魚前処理後試料)

実証データ：回収影響率 187～252% (PCB #118 25 µg/L : DMSO 溶液)

妨害物質 フミン酸ナトリウム 0～50mg/L

キット反応には試料水の1,000倍濃縮とDMSOへの置換操作が必要なため、これに伴う河川水中妨害物質の影響が、添加するフミン酸にプラスされることが懸念された。従って試料前処理操作を行わず、フミン酸ナトリウム DMSO 溶液の回収率への影響について確認を行った。

測定精度等

申請データ：機器分析との相関

生物(魚)試料 $R^2=0.96$ 、 $n=20$

土壌試料 <高濃度試料> $R^2=0.99$ 、<低濃度試料> $R^2=0.94$

実証データ：河川水試料の測定

ELISA 法	水質環境基準値(0.5 µg/L)未満
	Total PCB(KC-500 換算量として) < 0.11 µg/L
	PCB #118 として < 0.01 µg/L
GC/MS 法	0.0002~0.015 µg/L

2. 実証対象技術及び実証対象製品の特性と説明

2.1 実証申請者

企 業 名：株式会社エンバイオテック・ラボラトリーズ

担当者所属・氏名：開発本部 奥山 亮

住 所：〒153-8073 東京都江東区青梅 2-45 タイム 24 ビル 4F

電話番号：03-5531-5235

F A X 番号：03-5531-5236

e-mail アドレス：okuyama@enbiotec.co.jp

2.2 実証対象技術の原理

本実証対象製品は、PCB#118 に対する特異的なモノクローナル抗体を応用した、環境中（対象環境媒体：土壌，生物）の PCB 測定 ELISA キットである。

この ELISA キットの反応原理は競合反応（PCB 濃度が高い試料では吸光度が低く、PCB 濃度が低い試料では吸光度が高い）で、マイクロプレート（96 ウェル）を使用したキットである。

2.3 実証対象製品のデータ（性能，製品製造者，製品番号等）

実証対象製品のデータは、表 1 に示したとおりである。

3. 実証試験実施体制

3.1 実証試験申請者

所属部署 : 兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部

担当者氏名 : 吉岡 昌徳

住 所 : 〒654-0037 神戸市須磨区行平町 3-1-27

電話番号 : 078-735-6911

F A X 番号 : 078-735-7817

e-mail アドレス : Masanori_yoshioka@pref.hyogo.jp

3.2 実証試験実施者

所属部署 : 兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部

担当者氏名 : 北本 寛明

住 所 : 〒654-0037 神戸市須磨区行平町 3-1-27

電話番号 : 078-735-6911

F A X 番号 : 078-735-7817

e-mail アドレス : Hiroaki_Kitamoto@pref.hyogo.jp

3.3 実証試験実施場所

(1) ELISA 法

兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部

(2) 機器分析法

兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部

3.4 実証試験実施期間

平成 17 年 2 月 9 日 ~ 平成 17 年 3 月 11 日

4. 試験方法

4.1 共通して行う試験操作

「4.2 基本的な性能」および「4.3 実用的な性能」において、以下の方法は共通である。

(1) 製品の操作

製品の操作にあたっては、製品の取扱説明書を遵守するとともに、ELISA 分析に係わる品質管理マニュアルの試験操作手順（一般的な事項）に従って行った。

(2) 検量線作成用標準溶液の調製

製品の取扱説明書に記載の方法により、検量線用標準溶液の希釈系列を調製した。

(3) 吸光度の測定

吸光度は、マイクロプレートリーダー（日本バイオ・ラッドラボラトリーズ(株)社製 マイクロプレートリーダー モデル 680）で測定し、検量線作成用標準溶液および各試験用試料溶液の吸光度とした。

(4) 検量線の作成

プレート毎に同時に波長 450nm で測定した標準溶液指定濃度系列の吸光度（3重測定の平均値）から、4-parameter logistic fitting 後、検量線を作成した（検量線作成用の解析ソフト：日本バイオ・ラッドラボラトリーズ(株)社製 マイクロプレートマネージャー5.2/PC（Windows））。

(5) 実測濃度の算出

「(4)検量線の作成」で作成した検量線を用いて、各試験用試料溶液の吸光度から各実測濃度を算出した。

4.2 基本的な性能

(1) 測定範囲

試験条件

本製品の測定範囲における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.1 測定範囲の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・測定範囲（標準試料試験）
対象物質	ポリ塩化ビフェニル(PCB) IUPAC #118
対象製品名	PCB EIA System
製品番号	ロット番号 QJ19
製造年月日	- (有効期限：2005.4.5.)
測定範囲（製品仕様）	6.5～250 µg/L（最終 DMSO 検液中の PCB #118 濃度として）
試験日時	平成 17 年 2 月 9 日 13：00～16：05
試験場所	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部
試験時室内温度	22～24 (インキュベーター温度：24.0～24.8)
使用した市販標準品	PCB #118 (2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl) AccuStandard 社 製品名 C-118N ロット番号 050202JR-AC
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5.2/PC (Windows) (日本バイオ・ラッドラボラトリーズ(株)社製)
試験機関・担当者	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部 北本寛明

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

(2) 検出下限および定量下限

試験条件

本製品の検出下限および定量下限における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.2 検出下限および定量下限の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・検出下限および定量下限（標準試料試験）
対象物質	ポリ塩化ビフェニル(PCB) IUPAC #118
対象製品名	PCB EIA System
製品番号	ロット番号 QJ19
製造年月日	- (有効期限：2005.4.5.)
測定範囲（製品仕様）	6.5～250 µg/L（最終 DMSO 検液中の PCB #118 濃度として）
試験日時	平成 17 年 2 月 9 日 13：00～16：05
試験場所	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部
試験時室内温度	22～24 (インキュベーター温度：24.0～24.8)
使用した市販標準品	PCB #118 (2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl) AccuStandard 社 製品名 C-118N ロット番号 050202JR-AC
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5.2/PC (Windows) (日本バイオ・ラッドラボラトリーズ(株)社製)
試験機関・担当者	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部 北本寛明

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

(3) 繰返し再現性

試験条件

本製品の繰返し再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.3 繰返し再現性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・繰返し再現性（標準試料試験）
対象物質	ポリ塩化ビフェニル(PCB) IUPAC #118
対象製品名	PCB EIA System
製品番号	ロット番号 QJ19
製造年月日	- (有効期限：2005.4.5.)
測定範囲（製品仕様）	6.5～250 µg/L（最終 DMSO 検液中の PCB #118 濃度として）
試験日時	平成 17 年 2 月 9 日 13：00～16：05
試験場所	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部
試験時室内温度	22～24 (インキュベーター温度：24.0～24.8)
使用した市販標準品	PCB #118 (2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl) AccuStandard 社 製品名 C-118N ロット番号 050202JR-AC
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5.2/PC (Windows) (日本バイオ・ラッドラボラトリーズ(株)社製)
試験機関・担当者	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部 北本寛明

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

(4) 日間再現性

試験条件

本製品の日間再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.4 日間再現性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・日間再現性（標準試料試験）
対象物質	ポリ塩化ビフェニル(PCB) IUPAC #118
対象製品名	PCB EIA System
製品番号	ロット番号 QJ19
製造年月日	- (有効期限：2005.4.5.)
測定範囲（製品仕様）	6.5～250 µg/L（最終 DMSO 検液中の PCB #118 濃度として）
試験日時	平成 17 年 2 月 9 日 13：00～16：05 平成 17 年 2 月 10 日 09：00～13：26 平成 17 年 2 月 11 日 15：30～18：10
試験場所	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部
試験時室内温度	22～24 (2/9), 21～26 (2/10), 22.0～22.5 (2/11) ヒューター温度：24～24.8 (2/9), 24.5 (2/10), 24 (2/11)
使用した市販標準品	PCB #118 (2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl) AccuStandard 社 製品名 C-118N ロット番号 050202JR-AC
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5.2/PC (Windows) (日本バイオ・ラッドラボラトリーズ(株)社製)
試験機関・担当者	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部 北本寛明

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

(5) 期間再現性

試験条件

本製品の期間再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.5 期間再現性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・期間再現性（標準試料試験）
対象物質	ポリ塩化ビフェニル(PCB) IUPAC #118
対象製品名	PCB EIA System
製品番号	ロット番号 QJ19
製造年月日	- (有効期限：2005.4.5.)
測定範囲（製品仕様）	6.5～250 µg/L（最終 DMSO 検液中の PCB #118 濃度として）
試験日時	平成 17 年 2 月 9 日 13：00～16：05 平成 17 年 3 月 11 日 09：50～13：30
試験場所	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部
試験時室内温度	(2/9) 22～24 インキュベーター温度：24～24.8 (3/11) 24.5～24.5 インキュベーター温度：24～25.5
使用した市販標準品	PCB #118 (2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl) AccuStandard 社 製品名 C-118N ロット番号 050202JR-AC
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5.2/PC (Windows) (日本バイオ・ラッドラボラトリーズ(株)社製)
試験機関・担当者	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部 北本寛明

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

(6) プレート間再現性

試験条件

本製品のプレート間再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.6 プレート間再現性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・プレート間再現性（標準試料試験）
対象物質	ポリ塩化ビフェニル(PCB) IUPAC #118
対象製品名	PCB EIA System
製品番号	ロット番号 QJ19 RB07
製造年月日	- (有効期限：2005.4.5.(QJ19)) - (有効期限：2005.8.12.(RB07))
測定範囲（製品仕様）	6.5 ~ 250 µg/L（最終 DMSO 検液中の PCB #118 濃度として）
試験日時	平成 17 年 2 月 10 日 09:00 ~ 17:42
試験場所	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部
試験時室内温度	21 ~ 26 °C、インキュベーター温度：24~25 °C
使用した市販標準品	PCB #118 (2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl) AccuStandard 社 製品名 C-118N ロット番号 050202JR-AC
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5.2/PC (Windows) (日本バイオ・ラッドラボラトリーズ(株)社製)
試験機関・担当者	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部 北本寛明

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

(7) 交差反応性

試験条件

本製品の交差反応性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.7 交差反応性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・交差反応性（標準試料試験）
対象物質	ポリ塩化ビフェニル(PCB) IUPAC #118
対象製品名	PCB EIA System
製品番号	ロット番号 QJ19
製造年月日	- (有効期限：2005.4.5.)
測定範囲（製品仕様）	6.5～250 µg/L（最終 DMSO 検液中の PCB #118 濃度として）
試験日時	平成 17 年 2 月 11 日 15：30～18：10 平成 17 年 3 月 11 日 09：50～13：30（追加試験）
試験場所	兵庫県立健康環境科学研究所 センター 安全科学部
試験時室内温度	(2/11) 22.0～22.5 インキュベーター温度：24 (3/11) 24.5～24.5 インキュベーター温度：24～25.5（追加試験）
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5.2/PC（Windows）（日本バイオ・ラッドラボラトリーズ(株)社製）
試験機関・担当者	兵庫県立健康環境科学研究所 センター 安全科学部 北本寛明

表 4.2.8 使用した市販標準品

物質名（標準品）		試薬会社名	含量	製品番号	ロット番号
対象物質	PCB #118 (2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl)	AccuStandard	5mg	C-118N	050202JR-AC
類似物質	PCB #77 (3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl)	AccuStandard	25mg	C-077N	101200AG-AC
	PCB #105 (2,3,3',4,4'-Pentachlorobiphenyl)	AccuStandard	5mg	C-105N	19650
	HBB #153 (2,2',4,4',5,5'-Hexabromobiphenyl)	AccuStandard	10mg	B-153N	981105LB-AC-A

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

4.3 実用的な性能

(1) 回収特性

試験条件

本製品の回収特性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.3.1 回収特性の試験条件

項目	内容
実証項目	実用的な性能・回収特性（模擬環境試料試験）
対象物質	ポリ塩化ビフェニル(PCB) IUPAC #118
対象製品名	PCB EIA System
製品番号	ロット番号 QJ19
製造年月日	-（有効期限：2005.4.5.）
測定範囲（製品仕様）	6.5～250 µg/L（最終 DMSO 検液中の PCB118 濃度として）
試験日時	平成 17 年 2 月 16 日 13：00～15：18
試験場所	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部
試験時室内温度	23～24、インキュベーター温度：24
使用した市販標準品	PCB #118 (2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl) AccuStandard 社 製品名 C-118N ロット番号 050202JR-AC
使用した模擬環境試料	フミン酸ナトリウム ACROS ORGANICS 社 製品名 Humic acid sodium salt ロット番号 A019444301
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5.2/PC (Windows) (日本バイオ・ラッドラボラトリーズ(株)社製)
試験機関・担当者	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部 北本寛明

試験操作

実証試験計画書の内容を多少変更して試験を実施した。

本実証試験対象製品で河川水中 PCB の水質環境基準値を測定する場合、河川水を 1,000 倍濃縮し最終的に DMSO 溶液とする必要がある。この際、河川水中の妨害物質として添加するフミン酸のキット測定への影響に、高濃縮された試料由来の妨害物質の影響がプラスして表れることが危惧された。従って河川水へのフミン酸添加の方法から、フミン酸ナトリウムの DMSO 溶液と市販標準品の混合液を試験対象とする方法に変更し、河川水中妨害物質としてのフミン酸の影響を検討した。

(2) 測定精度等

試験条件

本製品の測定精度等における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.3.2 測定精度等の試験条件

項目	内容
実証項目	実用的な性能・測定精度等（環境試料試験）
対象物質	ポリ塩化ビフェニル(PCB) IUPAC #118
対象製品名	PCB EIA System
製品番号	ロット番号 QJ19
製造年月日	-（有効期限：2005.4.5.）
測定範囲（製品仕様）	6.5～250 µg/L（最終 DMSO 検液中の PCB118 濃度として）
試験日時	平成 17 年 2 月 26 日 13：45～15：43
試験場所	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部
試験時室内温度	21.5～22.0、インキュベーター温度：23.5～24.0
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5.2/PC（Windows）（日本バイオ・ラッドラボラトリーズ(株)社製）
試験機関・担当者	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部 北本寛明

表 4.3.3 使用した環境試料

試料番号	地点名	採水日	採水量	備考
S1	千種川 坂越橋	平成 16 年 11 月 26 日	1L	pH 7.8, BOD 0.8 mg/L
S2	猪名川 利倉橋	平成 16 年 11 月 25 日	1L	pH 7.4, BOD 6.1 mg/L
S3	左門殿川 辰巳橋	平成 16 年 11 月 25 日	1L	pH 7.5, BOD 1.0 mg/L

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

5. 試験結果

5.1 基本的な性能

(1) 測定範囲

検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.1 検量線用標準溶液の測定データ

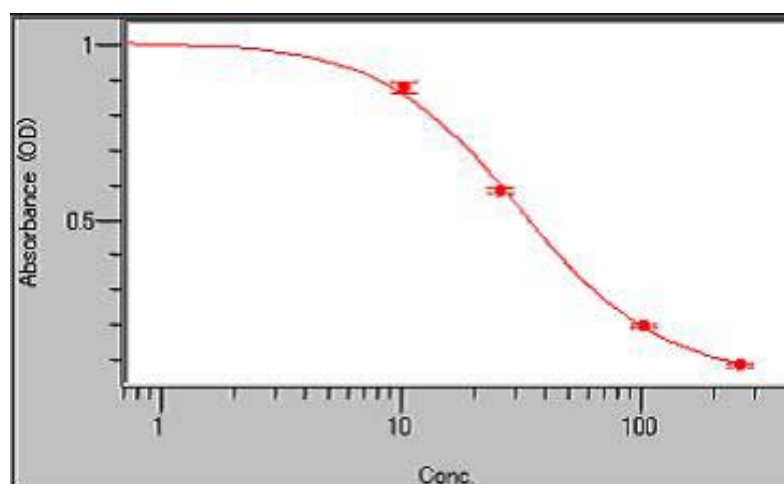
項目	単位	検量線用標準溶液						
		溶液 STD0	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	溶液 STD5	
所定濃度	μg/L	0	10	25	100	250	1,000	
実測回数	回	3						
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	0.986	0.911	0.606	0.221	0.105	- *
	2	-	1.027	0.899	0.591	0.215	0.102	- *
	3	-	1.019	0.874	0.602	0.209	0.097	- *

* 1,000 μg/L の吸光値がエラー値であったため削除した。

表 5.1.2 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D) / (1 + (X / C)^B$]

回帰式の係数	A	B	C	D
値	1.02	1.52	30.3	0.0711

$$\text{Abs} = (1.02 - 0.0711) / (1 + (\text{Conc} / 30.3)^{1.52}) + 0.0711$$



試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは，以下に示すとおりである。

表 5.1.3 対象物質試料溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液					
		溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4	溶液 S5	
調製濃度	μg/L	10	25	100	250	1,000	
実測回数	回	3					
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	0.891	0.617	0.219	0.102	0.092
	2	-	0.912	0.596	0.225	0.100	0.086
	3	-	0.886	0.62	0.216	0.098	0.082
	平均	-	0.896	0.611	0.220	0.100	0.087
換算濃度平均値	μg/L	8.8	25.4	92.1	297.8	- *	
標準偏差	μg/L	0.7	0.9	2.2	76.9	- *	
変動係数	%	8.1	3.5	2.5	14.8	- *	
相対値**	%	88.3	101.6	92.1	119.1	- *	

* 検量線用標準 1,000 μg/L の吸光度がエラー値であったため、判定不能であった。

** 調製濃度を 100%としたときの各実測濃度（3重測定の平均値）との割合（%）

(2) 検出下限および定量下限

検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.4 検量線用標準溶液の測定データ

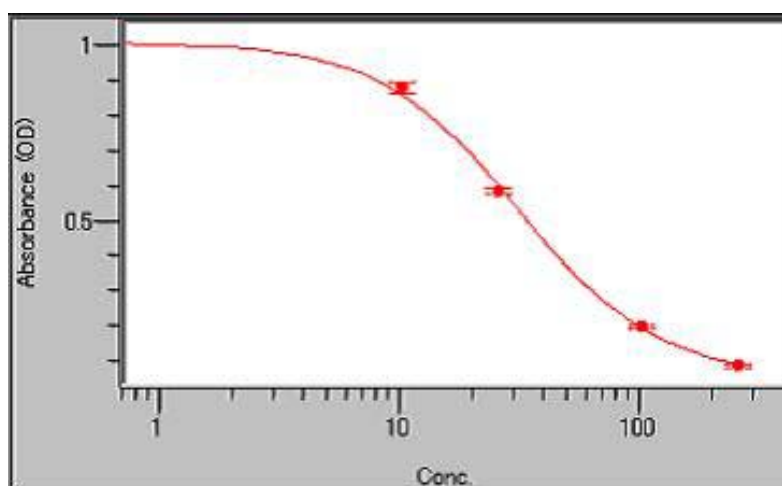
項目	単位	検量線用標準溶液						
		溶液 STD0	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	溶液 STD5	
所定濃度	μg/L	0	10	25	100	250	1,000	
実測回数	回	3						
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	0.986	0.911	0.606	0.221	0.105	- *
	2	-	1.027	0.899	0.591	0.215	0.102	- *
	3	-	1.019	0.874	0.602	0.209	0.097	- *

* 検量線用標準 1,000 μg/L の吸光値がエラー値であったため削除した。

表 5.1.5 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D) / (1 + (X / C)^B)$]

回帰式の係数	A	B	C	D
値	1.02	1.52	30.3	0.0711

$$\text{Abs} = (1.02 - 0.0711) / (1 + (\text{Conc} / 30.3)^{1.52}) + 0.0711$$



試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは，以下に示すとおりである。

表 5.1.6 対象物質試料溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液								
		溶液 S1								
調製濃度	μg/L	10								
実測回数	回	1	2	3	4	5	6	7	8	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	0.741	0.754	0.789	0.774	0.797	0.784	0.806	0.805
	2	-	0.728	0.755	0.775	0.763	0.785	0.779	0.804	0.770
	3	-	0.722	0.748	0.760	0.751	0.773	0.786	0.773	0.758
	平均	-	0.730	0.752	0.775	0.763	0.785	0.783	0.794	0.778
濃度換算平均値	μg/L	17.8	16.5	15.3	15.9	14.7	14.8	14.2	15.1	
平均	μg/L	15.6								
標準偏差	μg/L	1.2								
変動係数	%	7.4								

検出下限 (3SD) = 3.5 μg/L

定量下限 (10SD) = 11.5 μg/L

(3) 繰返し再現性

検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.7 検量線用標準溶液の測定データ

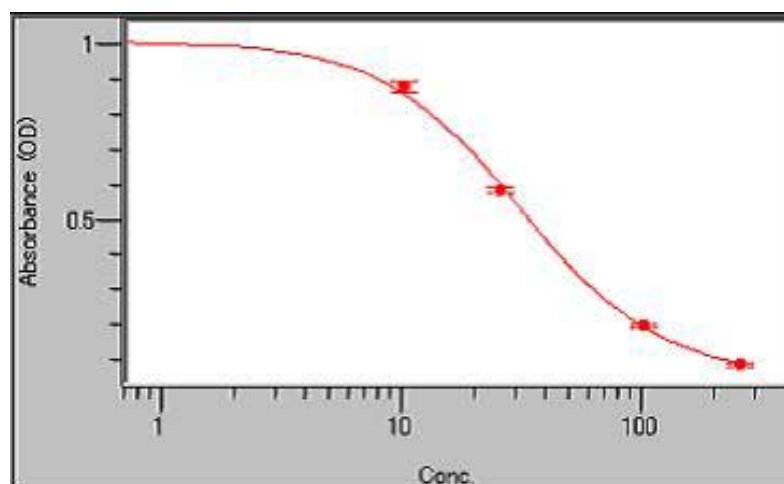
項目	単位	検量線用標準溶液						
		溶液 STD0	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	溶液 STD5	
所定濃度	μg/L	0	10	25	100	250	1,000	
実測回数	回	3						
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	0.986	0.911	0.606	0.221	0.105	- *
	2	-	1.027	0.899	0.591	0.215	0.102	- *
	3	-	1.019	0.874	0.602	0.209	0.097	- *

* 1,000 μg/L の吸光値がエラー値であったため削除した。

表 5.1.8 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B$]

回帰式の係数	A	B	C	D
値	1.02	1.52	30.3	0.0711

$$\text{Abs} = (1.02 - 0.0711) / (1 + (\text{Conc} / 30.3)^{1.52}) + 0.0711$$



試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは，以下に示すとおりである。

表 5.1.9 対象物質試料溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液								
		溶液 S2								
調製濃度	μg/L	25								
実測回数	回目	1	2	3	4	5	6	7	8	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	0.492	0.538	0.515	0.503	0.493	0.545	0.536	0.509
	2	-	0.515	0.517	0.533	0.491	0.510	0.499	0.495	0.472
	3	-	0.483	0.477	0.485	0.498	0.479	0.487	0.500	0.472
	平均	-	0.497	0.511	0.511	0.497	0.494	0.510	0.510	0.484
濃度換算平均値	μg/L	34.9	33.6	33.6	34.1	35.2	33.7	33.6	36.2	
平均	μg/L	34.5								
標準偏差	μg/L	1.0								
変動係数	%	2.8								

(4) 日間再現性

検量線作成記録

本製品における 1 日目の検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.10 検量線用標準溶液の測定データ

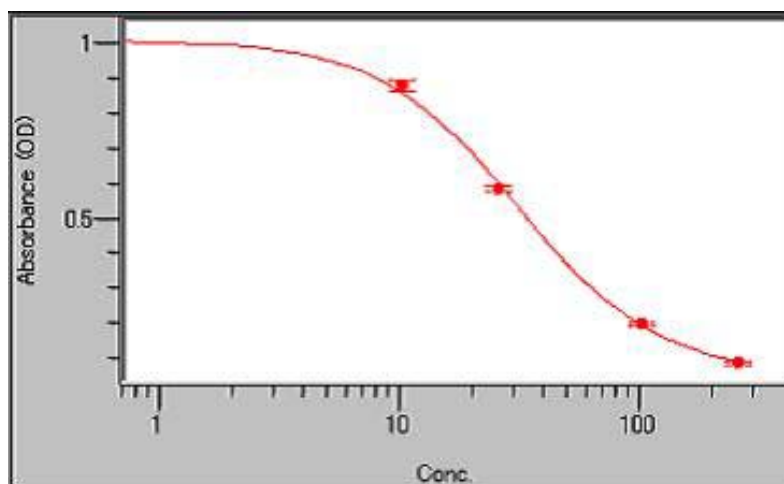
項目	単位	検量線用標準溶液						
		溶液 STD0	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	溶液 STD5	
所定濃度	μg/L	0	10	25	100	250	1,000	
実測回数	回	3						
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	0.986	0.911	0.606	0.221	0.105	- *
	2	-	1.027	0.899	0.591	0.215	0.102	- *
	3	-	1.019	0.874	0.602	0.209	0.097	- *

* 1,000 μg/L の吸光度がエラー値であったため削除した。

表 5.1.11 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B$]

回帰式の係数	A	B	C	D
値	1.02	1.52	30.3	0.0711

$$\text{Abs} = (1.02 - 0.0711) / (1 + (\text{Conc} / 30.3)^{1.52}) + 0.0711$$



本製品における2日目の検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

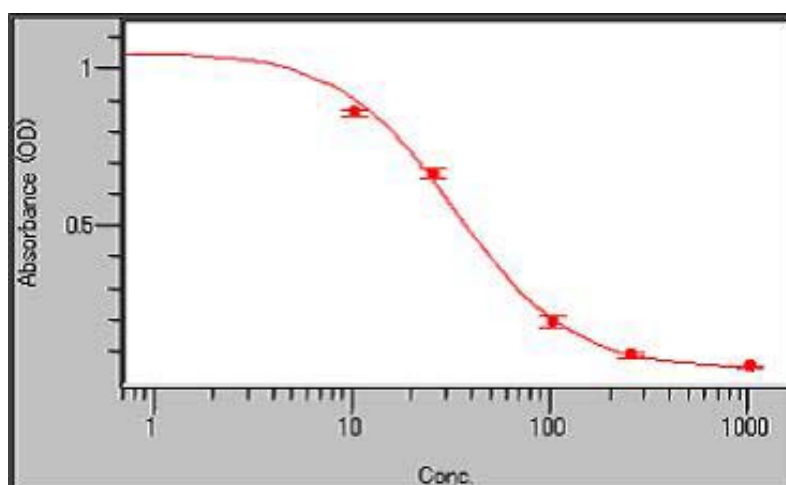
表 5.1.12 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液						
		溶液 STD0	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	溶液 STD5	
所定濃度	μg/L	0	10	25	100	250	1,000	
実測回数	回	3						
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.071	0.875	0.700	0.207	0.101	0.070
	2	-	1.115	0.889	0.672	0.230	0.111	0.070
	3	-	1.075	0.871	0.673	0.196	0.098	0.065

表 5.1.13 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B$]

回帰式の係数	A	B	C	D
値	1.07	1.5	31.9	0.0608

$$\text{Abs} = (1.07 - 0.0608) / (1 + (\text{Conc} / 31.9)^{1.5}) + 0.0608$$



本製品における3日目の検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

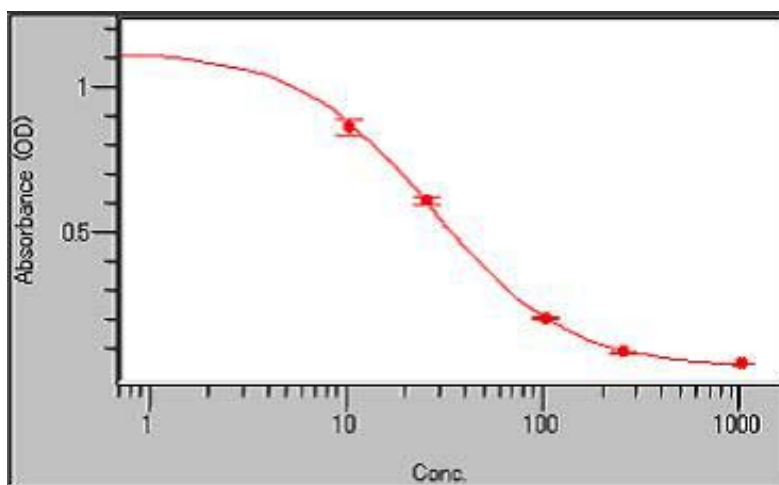
表 5.1.14 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液						
		溶液 STD0	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	溶液 STD5	
所定濃度	μg/L	0	10	25	100	250	1,000	
実測回数	回	3						
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.096	0.891	0.627	0.228	0.110	0.067
	2	-	1.180	0.899	0.642	0.224	0.104	0.068
	3	-	1.165	0.849	0.617	0.220	0.105	0.066

表 5.1.15 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B$]

回帰式の係数	A	B	C	D
値	1.14	1.28	26.4	0.0546

$$\text{Abs} = (1.14 - 0.0546) / (1 + (\text{Conc} / 26.4)^{1.28}) + 0.0546$$



試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.16 対象物質試料溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液																
		溶液 S1			溶液 S2			溶液 S3			溶液 S4			溶液 S5				
		1 日	2 日	3 日	1 日	2 日	3 日	1 日	2 日	3 日	1 日	2 日	3 日	1 日	2 日	3 日		
調製濃度	μg/L	10			25			100			250			1,000				
実測回数	回	3																
ELISA 実測	吸光度	1	-	0.891	0.883	0.834	0.617	0.610	0.578	0.219	0.175	0.174	0.102	0.089	0.096	0.092	0.074	0.065
		2	-	0.912	0.895	0.822	0.596	0.590	0.581	0.225	0.172	0.174	0.100	0.090	0.095	0.086	0.071	0.069
		3	-	0.886	0.811	0.807	0.620	0.569	0.550	0.216	0.168	0.168	0.098	0.086	0.097	0.082	0.068	0.067
		平均	-	0.896	0.863	0.821	0.611	0.590	0.570	0.220	0.172	0.172	0.100	0.088	0.096	0.087	0.071	0.067
換算濃度 平均値	μg/L	8.8	12.9	13.4	25.4	30.0	28.7	92.1	129.5	137.4	297.8	349.5	328.6	- *	631.0	811.4		
平均	μg/L	11.7			28.0			119.6			325.3			- *				
標準偏差	μg/L	2.5			2.4			24.2			26.0			- *				
変動係数	%	21.4			8.4			20.2			8.0			- *				

* 検量線用標準品 1,000 μg/L の吸光値がエラー値であったことから、濃度算出以下の計算が不能であった。

(5) 期間再現性

検量線作成記録

本製品における最初の検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.17 検量線用標準溶液の測定データ

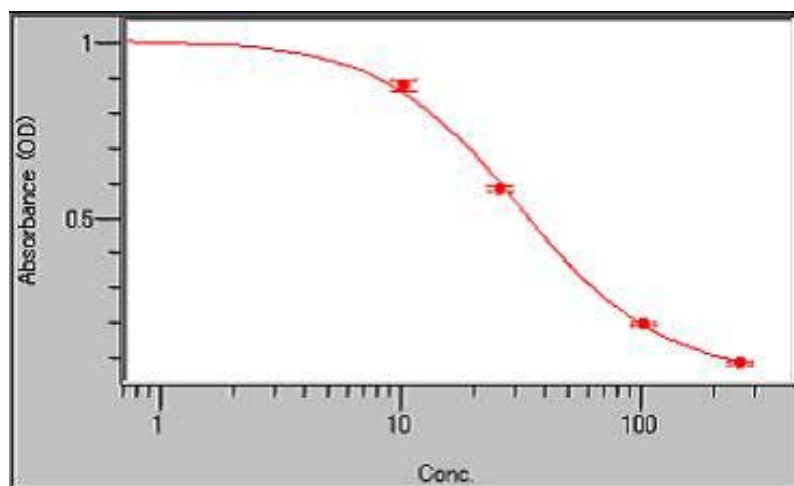
項目	単位	検量線用標準溶液						
		溶液 STD0	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	溶液 STD5	
所定濃度	μg/L	0	10	25	100	250	1,000	
実測回数	回	3						
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	0.986	0.911	0.606	0.221	0.105	- *
	2	-	1.027	0.899	0.591	0.215	0.102	- *
	3	-	1.019	0.874	0.602	0.209	0.097	- *

* 1,000 μg/L の吸光値がエラー値であったため削除した。

表 5.1.18 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B$]

回帰式の係数	A	B	C	D
値	1.02	1.52	30.3	0.0711

$$\text{Abs} = (1.02 - 0.0711) / (1 + (\text{Conc} / 30.3)^{1.52}) + 0.0711$$



本製品における1ヶ月目の検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

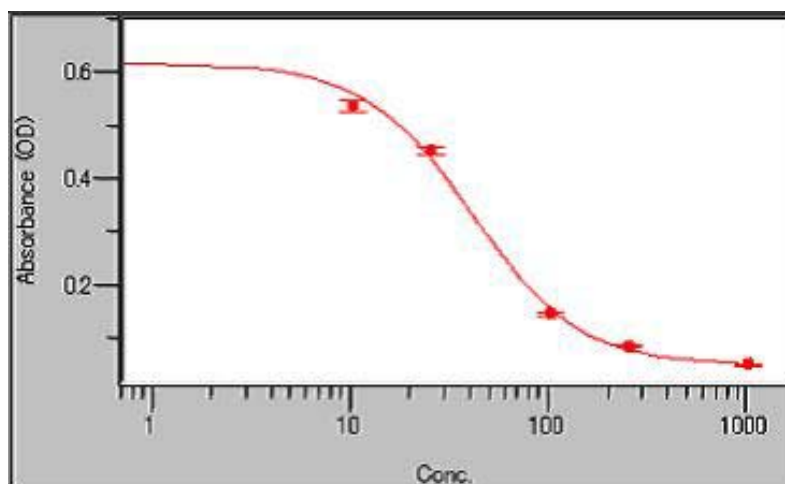
表 5.1.19 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液						
		溶液 STD0	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	溶液 STD5	
所定濃度	μg/L	0	10	25	100	250	1,000	
実測回数	回	3						
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	0.591	0.552	0.459	0.159	0.094	0.059
	2	-	0.650	0.535	0.457	0.149	0.091	0.057
	3	-	0.668	0.552	0.469	0.154	0.092	0.058

表 5.1.20 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B$]

回帰式の係数	A	B	C	D
値	0.627	1.61	39.9	0.0571

$$\text{Abs} = (0.627 - 0.0571) / (1 + (\text{Conc} / 39.9)^{1.61}) + 0.0571$$



試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは，以下に示すとおりである。

表 5.1.21 対象物質試料溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液										
		溶液 S1		溶液 S2		溶液 S3		溶液 S4		溶液 S5		
		最初	1ヶ月	最初	1ヶ月	最初	1ヶ月	最初	1ヶ月	最初	1ヶ月	
調製濃度	μg/L	10		25		100		250		1,000		
実測回数	回	3										
ELISA実測 吸光度	1	-	0.891	0.530	0.617	0.363	0.219	0.137	0.102	0.077	0.092	0.060
	2	-	0.912	0.547	0.596	0.368	0.225	0.141	0.100	0.072	0.086	0.060
	3	-	0.886	0.513	0.62	0.390	0.216	0.151	0.098	0.088	0.082	0.061
	平均	-	0.896	0.530	0.611	0.374	0.22	0.143	0.100	0.079	0.087	0.060
換算濃度 平均値	μg/L	9.2	14.9	25.2	34.7	89.3	117.2	519.2	310.1	- *	1011.4	
平均	μg/L	12.0		30.0		103.3		414.6		- *		
標準偏差	μg/L	0.7	2.0	0.9	2.2	2.2	7.0	76.9	71.6	- *	106.2	
変動係数	%	8.1	13.2	3.5	6.3	2.5	6.0	14.8	23.1	- *	10.5	

* 検量線用標準品 1,000 μg/L の吸光値がエラー値であったことから、濃度算出以下の計算が不能であった。

(6) プレート間再現性

検量線作成記録

本製品におけるプレート A の検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

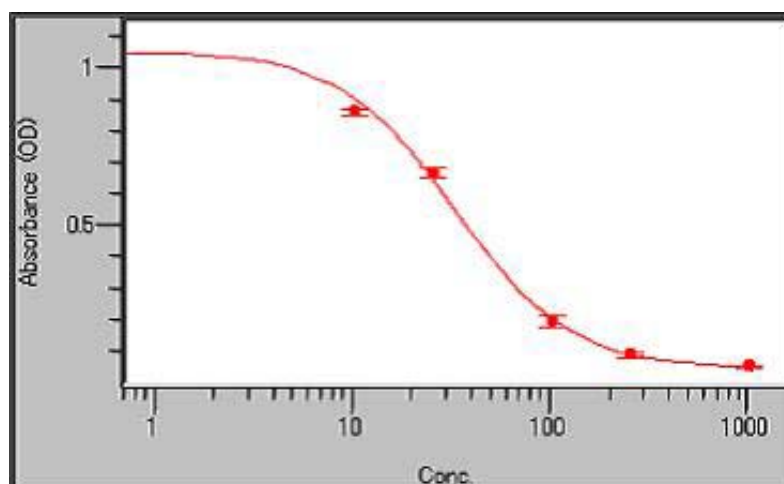
表 5.1.22 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液						
		溶液 STD0	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	溶液 STD5	
所定濃度	μg/L	0	10	25	100	250	1,000	
実測回数	回	3						
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.071	0.875	0.700	0.207	0.101	0.070
	2	-	1.115	0.889	0.672	0.230	0.111	0.070
	3	-	1.075	0.871	0.673	0.196	0.098	0.065

表 5.1.23 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B$]

回帰式の係数	A	B	C	D
値	1.07	1.5	31.9	0.0608

$$\text{Abs} = (1.07 - 0.0608) / (1 + (\text{Conc} / 31.9)^{1.5}) + 0.0608$$



本製品におけるプレート B の検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

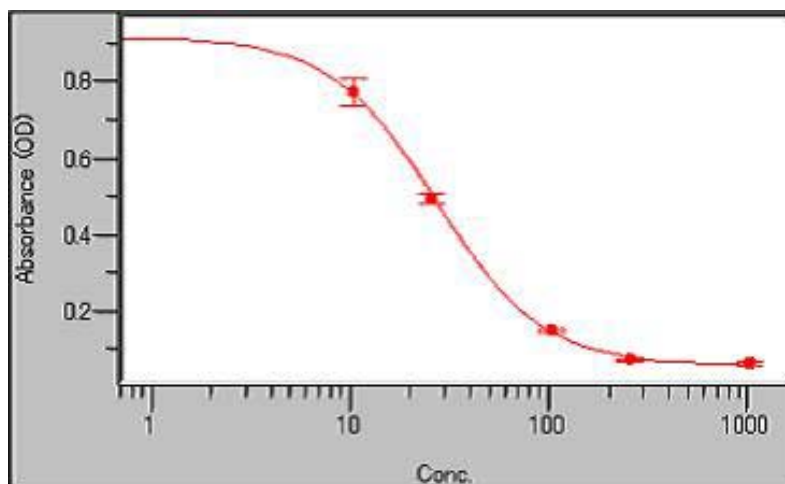
表 5.1.24 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液						
		溶液 STD0	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	溶液 STD5	
所定濃度	μg/L	0	10	25	100	250	1,000	
実測回数	回	3						
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	0.917	0.816	0.519	0.167	0.085	0.080
	2	-	0.926	0.800	0.507	0.162	0.084	0.076
	3	-	0.939	0.749	0.494	0.157	0.081	0.073

表 5.1.25 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B$]

回帰式の係数	A	B	C	D
値	0.93	1.64	25.9	0.0706

$$\text{Abs} = (0.93 - 0.0706) / (1 + (\text{Conc} / 25.9)^{1.64}) + 0.0706$$



本製品におけるプレート C の検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

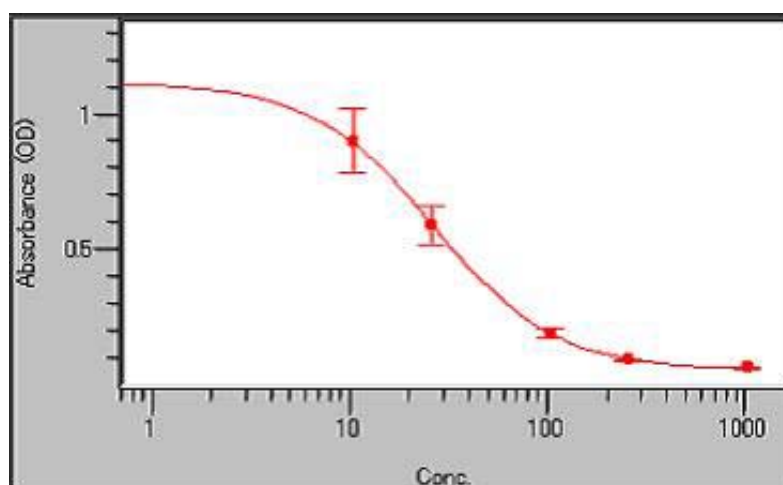
表 5.1.26 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液						
		溶液 STD0	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	溶液 STD5	
所定濃度	μg/L	0	10	25	100	250	1,000	
実測回数	回	3						
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.104	0.924	0.626	0.207	0.113	0.084
	2	-	0.979	0.799	0.528	0.200	0.109	0.084
	3	-	1.305	1.037	0.670	0.231	0.120	0.085

表 5.1.27 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B$]

回帰式の係数	A	B	C	D
値	1.13	1.43	25.6	0.0782

$$\text{Abs} = (1.13 - 0.0782) / (1 + (\text{Conc} / 25.6)^{1.43}) + 0.0782$$



試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは，以下に示すとおりである。

表 5.1.28 対象物質試料溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液																
		溶液 S1			溶液 S2			溶液 S3			溶液 S4			溶液 S5				
		プレート			プレート			プレート			プレート			プレート				
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C		
調製濃度	μg/L	10			25			100			250			1,000				
実測回数	回	3																
E L I S A 実測	吸光度	1	-	0.883	0.805	0.936	0.610	0.625	0.745	0.175	0.186	0.237	0.089	0.089	0.099	0.074	0.073	0.063
		2	-	0.895	0.820	0.787	0.590	0.611	0.637	0.172	0.187	0.218	0.090	0.091	0.089	0.071	0.068	0.058
		3	-	0.811	0.830	0.816	0.569	0.636	0.625	0.168	0.190	0.194	0.086	0.094	0.088	0.068	0.069	0.058
		平均	-	0.863	0.818	0.846	0.590	0.624	0.669	0.172	0.188	0.216	0.088	0.091	0.092	0.071	0.070	0.060
換算濃度 平均値	μg/L	12.9	8.1	12.9	30.0	18.1	21.8	129.4	80.0	96.7	349.4	249.1	557.2	631.0	>1,000*	>1,000*		
平均	μg/L	11.3			23.3			102.1			385.2			- *				
標準偏差	μg/L	2.8			6.1			25.1			157.1			- *				
変動係数	%	24.4			26.2			24.6			40.8			- *				

(注) プレート A, B は同一ロット，プレート C は異ロット。

* 解析ソフトで判定不能であったため、その後の計算についても困難であった。

(7) 交差反応性

検量線作成記録

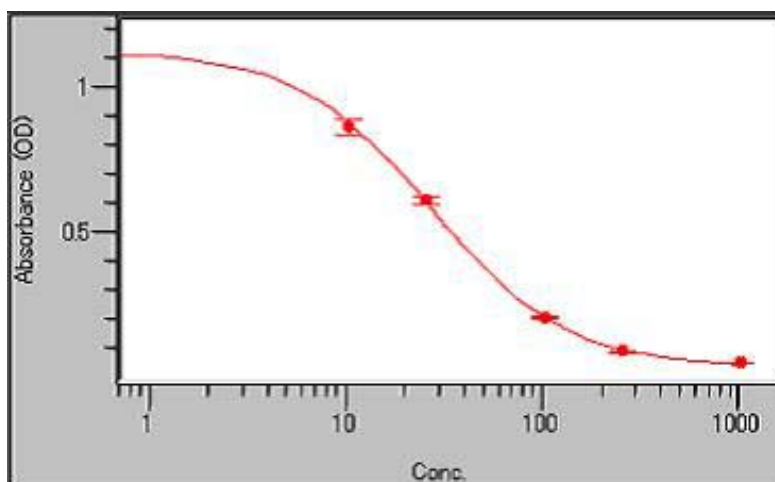
表 5.1.29 検量線用標準溶液の測定データ

	単位	検量線用標準溶液						
		溶液 STD0	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	溶液 STD5	
	μg/L	0	10	25	100	250	1,000	
	回	3						
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.096	0.891	0.627	0.228	0.110	0.067
	2	-	1.180	0.899	0.642	0.224	0.104	0.068
	3	-	1.165	0.849	0.617	0.220	0.105	0.066

表 5.1.30 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B$]

回帰式の係数	A	B	C	D
値	1.14	0.0516	26.4	0.0546

$$\text{Abs} = (1.14 - 0.0546) / (1 + (\text{Conc} / 26.4)^{1.28}) + 0.0546$$



試験結果記録

表 5.1.31 各物質の 50%発色反応阻害

	単位	PCB#118	PCB#77	PCB#105	HBB#153
50%阻害濃度	μg/L	23.3	118.1	636.0	>10,000*
交差率	%	100.0	19.7	3.7	<0.5*

* 追加試験結果による。

表 5.1.32 交差反応物質の測定データ

		0 μg/L	10 μg/L	25 μg/L	100 μg/L	250 μg/L	1,000 μg/L
PCB #118	吸光値 1	1.112	0.834	0.578	0.174	0.096	0.065
	吸光値 2	1.100	0.822	0.581	0.174	0.095	0.069
	吸光値 3	1.010	0.807	0.550	0.168	0.097	0.067
	平均	1.074	0.821	0.570	0.172	0.096	0.067
	CV (%)	5.2	1.7	3.0	2.0	1.0	3.0
PCB #77	吸光値 1	1.131	1.098	0.983	0.656	0.354	0.132
	吸光値 2	1.124	1.111	0.996	0.641	0.348	0.129
	吸光値 3	1.145	1.094	0.990	0.626	0.289	0.123
	平均	1.133	1.101	0.990	0.641	0.330	0.128
	CV (%)	0.9	0.8	0.7	2.3	10.9	3.6
PCB #105	吸光値 1	1.182	1.132	1.178	1.023	0.905	0.429
	吸光値 2	1.127	1.153	1.133	1.047	0.893	0.429
	吸光値 3	1.169	1.131	1.204	1.041	0.904	0.426
	平均	1.159	1.139	1.172	1.037	0.901	0.428
	CV (%)	2.5	1.1	3.1	1.2	0.7	0.4
HBB #153	吸光値 1	1.068	3.054	1.206	1.156	1.131	2.436
	吸光値 2	1.145	2.986	1.153	1.096	1.204	2.408
	吸光値 3	0.997	3.033	1.186	1.127	1.156	2.415
	平均	1.070	3.024	1.182	1.126	1.164	2.420
	CV (%)	6.9	1.2	2.3	2.7	3.2	0.6

(追加試験) HBB #153 追加試験

HBB #153 の交差反応性について、

- ・ 10~1,000 $\mu\text{g/L}$ の範囲では、発色反応阻害が見られなかった。
- ・ DMSO 溶液の吸光値より高くなるものが見られた。

の 2 点を確認されたため、次の追加試験を行った。

- ・ HBB #153 10~10,000 $\mu\text{g/L}$ の範囲での発色反応阻害の確認。
- ・ HBB #153 10~10,000 $\mu\text{g/L}$ と PCB #118 25 $\mu\text{g/L}$ 混合液による測定への影響確認。

この結果、

- ・ HBB #153 10~10,000 $\mu\text{g/L}$ の範囲での交差反応率は、 $<0.5\%$ であった。
- ・ 10~10,000 $\mu\text{g/L}$ の範囲での HBB #153 存在下での、PCB #118 25 $\mu\text{g/L}$ の測定結果は実濃度に対して 93~154%であった。

ことから、PCB #118 測定の HBB #153 による大きな反応阻害は、確認されなかった。

量線作成記録

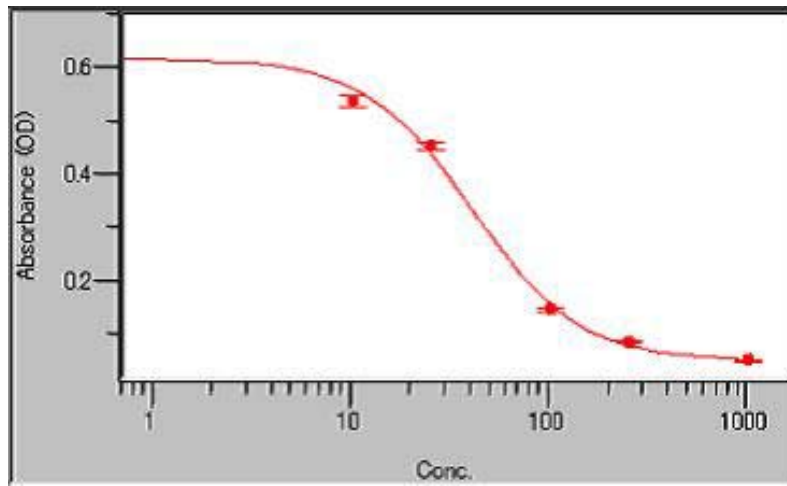
表 追-1 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液						
		溶液 STD0	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	溶液 STD5	
所定濃度	$\mu\text{g/L}$	0	10	25	100	250	1,000	
実測回数	回	3						
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	0.591	0.552	0.459	0.159	0.094	0.059
	2	-	0.650	0.535	0.457	0.149	0.091	0.057
	3	-	0.668	0.552	0.469	0.154	0.092	0.058

表 追-2 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B$]

回帰式の係数	A	B	C	D
値	値	0.627	1.61	39.9

$$\text{Abs} = (0.627 - 0.0571) / (1 + (\text{Conc} / 39.9)^{1.61}) + 0.0571$$



追加試験結果記録

表 追-3 HBB の吸光値及び PCB #118 測定への影響

項目		単位	試験用試料溶液						
HBB #153 濃度		μg/L	10	25	100	250	1,000	2,500	10,000
HBB #153	吸光値 1	-	0.740	0.760	0.737	0.745	0.835	0.723	0.881
	吸光値 2	-	0.752	0.767	0.811	0.745	0.754	0.687	0.805
	吸光値 3	-	0.804	0.819	0.824	0.767	0.743	0.693	0.815
	平均	-	0.765	0.782	0.791	0.752	0.777	0.701	0.834
	変動係数	%	4.4	4.1	5.9	1.7	6.5	2.8	5.0
HBB #153 + PCB #118 25 μg/L	吸光値 1	-	0.451	0.474	0.546	0.471	0.43	0.333	0.344
	吸光値 2	-	0.375	0.419	0.41	0.422	0.419	0.355	0.348
	吸光値 3	-	0.407	0.424	0.429	0.438	0.419	0.372	0.359
	平均吸光値	-	0.411	0.439	0.462	0.444	0.423	0.353	0.350
	PCB #118 濃度 1	μg/L	24.2	21.4	13.0	21.7	26.8	41.5	39.5
	PCB #118 濃度 2	μg/L	34.5	28.2	29.5	27.9	28.2	37.7	38.9
	PCB #118 濃度 3	μg/L	29.9	27.6	26.9	25.8	28.2	35.0	37.0
	換算濃度平均値	μg/L	29.5	25.7	23.1	25.1	27.8	38.0	38.5
	濃度の変動係数	%	17.6	14.8	38.3	12.4	3.0	8.6	3.4
	相対値	%	118	103	93	101	111	152	154

5.2 実用的な性能

(1) 回収特性

一般的に河川中 PCB 濃度は低値であるが、測定するには河川水試料の前処理で濃縮操作が必要となる。よって濾過した河川水 1L にフミン酸ナトリウムを更に添加すると、河川水中妨害物質の影響が添加するフミン酸ナトリウムにプラスされることが懸念された。

従って試料前処理操作は行わず、フミン酸ナトリウムの DMSO 溶液を用いて、フミン酸ナトリウムのみ反応への影響率の確認を行った。

- * 昭和 46 年 12 月 28 日付 環告 59 号「水質汚濁に関する環境基準について」中の、「人の健康の保護に関する環境基準」で定める、PCB の環境基準値では「検出されないこと」（定められた測定方法の定量限界を下回ることであり 0.0005mg/L 未満）とされている。

検量線作成記録

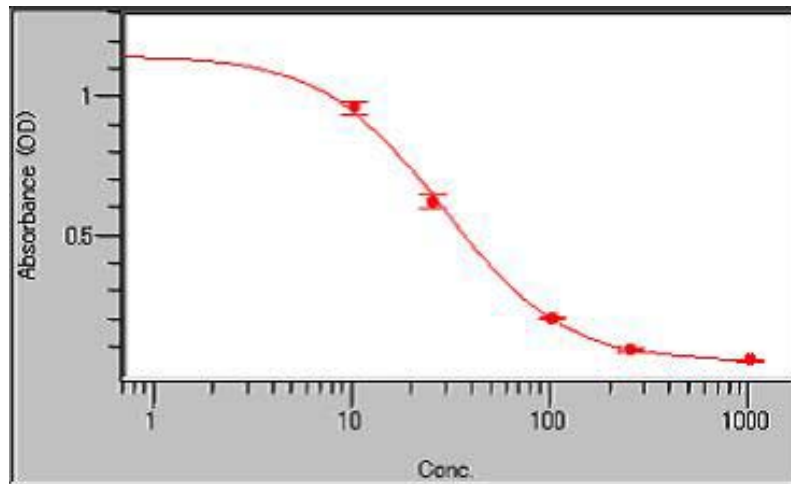
表 5.2.1 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液						
		溶液 STD0	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	溶液 STD5	
所定濃度	μg/L	0	10	25	100	250	1,000	
実測回数	回	3						
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.056	0.953	0.626	0.223	0.104	0.073
	2	-	1.201	0.996	0.671	0.225	0.113	0.070
	3	-	1.222	0.986	0.627	0.217	0.103	0.069

表 5.2.2 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B$]

回帰式の係数	A	B	C	D
値	1.17	1.43	27.7	0.064

$$\text{Abs} = (1.17 - 0.064) / (1 + (\text{Conc} / 27.7)^{1.43}) + 0.064$$



試験結果記録

表 5.2.3 フミン酸ナトリウム混合液の測定データ

項目		単位	フミン酸ナトリウム溶液 (含 PCB #118 25 µg/L)				
フミン酸ナトリウム ¹⁾		mg/L	0	1	5	10	50
実測回数		回	3				
ELISA 実測 (吸光度)	吸光値 1	-	0.626	0.457	0.393	0.342	0.307
	吸光値 2	-	0.671	0.464	0.405	0.370	0.331
	吸光値 3	-	0.627	0.492	0.434	0.368	0.334
	平均吸光値	-	0.641	0.471	0.411	0.360	0.324
各濃度の平均値		µg/L	26.1	40.3	47.8	55.9	63.1
濃度の変動係数		%	6.4	4.9	6.1	5.2	5.3
回収影響率 ²⁾		%	104	161	191	223	252

1) 試薬として用いたフミン酸ナトリウム(アクロス社製)の純度表示は50~60%であり、確定値として示されていないため、ここでは純度を考慮した濃度調整を行っていない。したがって、純度を考慮した場合には、フミン酸ナトリウム濃度として示した各濃度はそれぞれ約1/2となる。

2) フミン酸ナトリウムのDMSO溶液中に含まれるPCB #118量を100%としたときの、測定濃度の割合。

(2) 測定精度等

河川水試料中の PCB 濃度について、低濃度測定*のために 1,000 倍濃縮試料による測定を行った。

- * 昭和 46 年 12 月 28 日付 環告 59 号「水質汚濁に関する環境基準について」中の、「人の健康の保護に関する環境基準」で定める、PCB の環境基準値では「検出されないこと」(定められた測定方法の定量限界を下回ることであり 0.0005mg/L 未満)とされている。

検量線作成記録

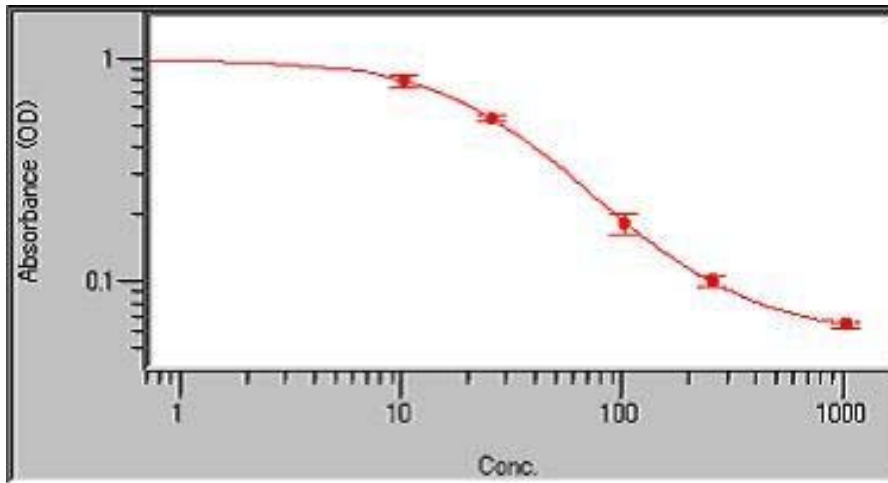
表 5.2.4 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液						
		溶液 STD0	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	溶液 STD5	
所定濃度	μg/L	0	10	25	100	250	1,000	
実測回数	回	3						
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	0.997	0.883	0.568	0.206	0.111	0.070
	2	-	1.082	0.785	0.563	0.202	0.109	0.068
	3	-	1.060	0.842	0.588	0.168	0.100	0.065

表 5.2.5 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B$]

回帰式の係数	A	B	C	D
値	1.05	1.39	26.1	0.0627

$$\text{Abs} = (1.05 - 0.0627) / (1 + (\text{Conc} / 26.1)^{1.39}) + 0.0627$$



試験結果記録

表 5.2.6 河川水試料測定データ

項目	単位	河川水			
		千種川 坂越橋	猪名川 利倉橋	左門殿川 辰巳橋	
前処理での濃縮倍率	倍	1,000			
実測回数	回	3			
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.035	0.984	1.018
	2	-	1.048	0.989	0.965
	3	-	1.067	1.017	1.032
	平均	-	1.050	0.997	1.005
変動係数	%	1.5	1.8	3.5	
ELISA 測定濃度 (換算値*) (PCB#118)	1	μg/L	0.0010	0.0037	0.0020
	2		N.D.	0.0035	0.0046
	3		N.D.	0.0021	0.0012
	平均		-	0.0031	0.0026
判定値			<0.011	<0.011	<0.011
変動係数	%	-	28.4	67.0	
ELISA 測定濃度 (換算値*) (KC-500 当量)	1	μg/L	0.011	0.041	0.023
	2		N.D.**	0.038	0.050
	3		N.D.**	0.023	0.014
	平均		-	0.034	0.029
判定値			<0.12	<0.12	<0.12
GC/MS 測定濃度	PCB#118	pg/L	3.5	4.9	54.0
	Total PCB	μg/L	0.0002	0.0013	0.015
	PCB #118 / Total PCB	-	57.1	265.3	277.8

* 換算値は試料当量で算出した。

** N.D. (Not Determine) 吸光度が測定範囲以上で濃度が出なかったもの。

ELISA の検出下限は 3.5 μg/L , 定量下限は 11.5 μg/L (DMSO 置換と共に 1,000 倍の濃縮を行った。)

GC/MS の検出下限は 0.01 ng/L , 定量下限は 0.03 ng/L

6 実証試験結果の検討と考察

(1) 製品性能の信頼性

実証試験で実施した基本性能 7 項目の全ての結果から、10 ~ 250 $\mu\text{g/L}$ の濃度範囲においては、ほぼ妥当な製品性能の信頼性を確認した。

(2) 一般環境モニタリングでの実用性

一般の河川水中 PCB 濃度は低値であることから、適切な前処理を行えば実用化が可能である。

(3) 製品操作等の簡便性

一般環境モニタリングでの使用を想定した場合、試料の前処理時間を除いて、2 時間で測定結果が得られた。また、同時に約 25 試料 (3 重測定) の測定が可能である。

なお、本試験での GC/MS 測定では、3 試料 (3 重測定) の測定に約 3 日が必要である。

計 画 書

環境技術実証モデル事業
化学物質に関する簡易モニタリング技術分野

化学物質に関する簡易モニタリング技術 実証試験計画書

環境技術開発者	株式会社エンバイオテック・ラボラトリーズ
技術・製品の名称	技術：ELISA法（酵素免疫測定法） 製品の名称：PCB EIA System

平成16年11月29日

兵 庫 県

はじめに

本実証試験計画書は、「化学物質に関する簡易モニタリング技術 実証試験要領（平成 16 年 8 月 31 日 環境省総合環境政策局）」（以下、「実証試験要領」という。）に基づいて選定された実証対象技術について、実証機関および環境技術開発者の 2 者が協議、合意の上、実証試験要領に準じて策定したものである。

（実証機関）

兵庫県立健康環境科学研究所

所長 吉村 幸男 印

（環境技術開発者）

株式会社エンバイオテック・ラボラトリーズ

代表取締役 水上 春樹 印

目 次

1. 実証試験の概要と目的.....	1
1.1 実証試験の概要と目的.....	1
1.2 実証試験の種類.....	1
2. 実証試験の参加組織と実証試験参加者の責任分掌.....	2
2.1 実証試験の参加組織.....	2
2.2 実施体制.....	2
2.3 実証試験参加者の責任分掌.....	3
3. 実証試験の対象とする化学物質簡易モニタリング技術の概要.....	4
3.1 実証対象製品の原理.....	4
3.2 実証対象製品のデータ.....	4
4. 実証試験のデザイン.....	6
4.1 実証試験の期間.....	6
4.2 実証試験の内容.....	7
4.3 実証対象製品の受け入れと管理.....	8
4.4 実証試験の方法.....	10
(1) 基本的な性能試験.....	11
測定範囲試験.....	11
検出下限および定量下限試験.....	11
繰返し再現性試験.....	12
日間再現性試験.....	12
期間再現性試験.....	12
プレート間再現性試験.....	12
交差反応性試験.....	12
(2) 実用的な性能試験.....	13
回収特性試験.....	13
測定精度試験.....	13
5. データの品質管理.....	14
6. データの管理, 分析, 表示.....	14
6.1 データ管理とその方法.....	14
6.2 データ分析と表示.....	14

7. 評価.....	14
------------	----

付録 1：取扱説明書

付録 2：自社による性能試験結果

付録 3：参考となるその他の文書やデータ

1. 実証試験の概要と目的

1.1 実証試験の概要と目的

既に適用可能な段階にありながら、環境保全効果等についての客観的な評価が行われていないために普及が進んでいない先進的環境技術について、その環境保全効果等を第三者が客観的に実証する事業をモデル的に実施することにより、環境技術実証の手法・体制の確立を図るとともに、環境技術の普及を促進し、環境保全と環境産業の発展に資することを目的とするものである。

本実証試験は、平成 16 年 8 月 31 日 環境省総合環境政策局が策定した実証試験要領に基づいて選定された実証対象技術について、同実証試験要領に準拠して実証試験を実施することで、製品性能の信頼性等を客観的に実証するものである。

本実証試験の化学物質簡易モニタリング技術とは、操作・管理の容易性や定量の高感度化などの特徴をもったもので、スクリーニング的な活用や簡易な方法で異常値を監視できることなどへの有用性が期待できるものを指すものとする。

対象とする技術は、一般環境モニタリングでの利活用の可能性を念頭に、以上の条件に該当するものとして、抗原抗体反応を応用した酵素標識免疫測定法（ELISA 法）による簡易分析技術とする。

ここでは、対象とする化学物質から、環境省で別途検討が進められているダイオキシン類を除外するものとする。

1.2 実証試験の種類

本実証試験では、以下の視点から実証を行うものとする。

- 製品性能の信頼性
- 一般環境モニタリングでの実用性
- 製品操作等の簡便性

2. 実証試験参加組織と実証試験参加者の責任分掌

2.1 実証試験参加組織

実証試験に参加する組織は、下表に示すとおりである。

表1 実証試験参加組織

実証機関	団体名	兵庫県立健康環境科学研究所
	住所	〒654-0037 神戸市須磨区行平町 3-1-27
	担当者所属・氏名	安全科学部 主任研究員 古武家善成
	電話番号	078-735-6911
	FAX 番号	078-735-7817
	E-mail アドレス	Yoshinari_kobuke@pref.hyogo.jp
環境技術開発者	企業名	株式会社エンバイオテック・ラボラトリーズ
	住所	〒135-8073 東京都江東区青梅 2-45 タイム 24 ビル 4F
	担当者所属・氏名	開発本部 奥山 亮
	電話番号	03-5531-5235
	FAX 番号	03-5531-5236
	E-mail アドレス	okuyama@enbiotec.co.jp

2.2 実施体制

実証試験の実施体制は、下図に示すとおりである。

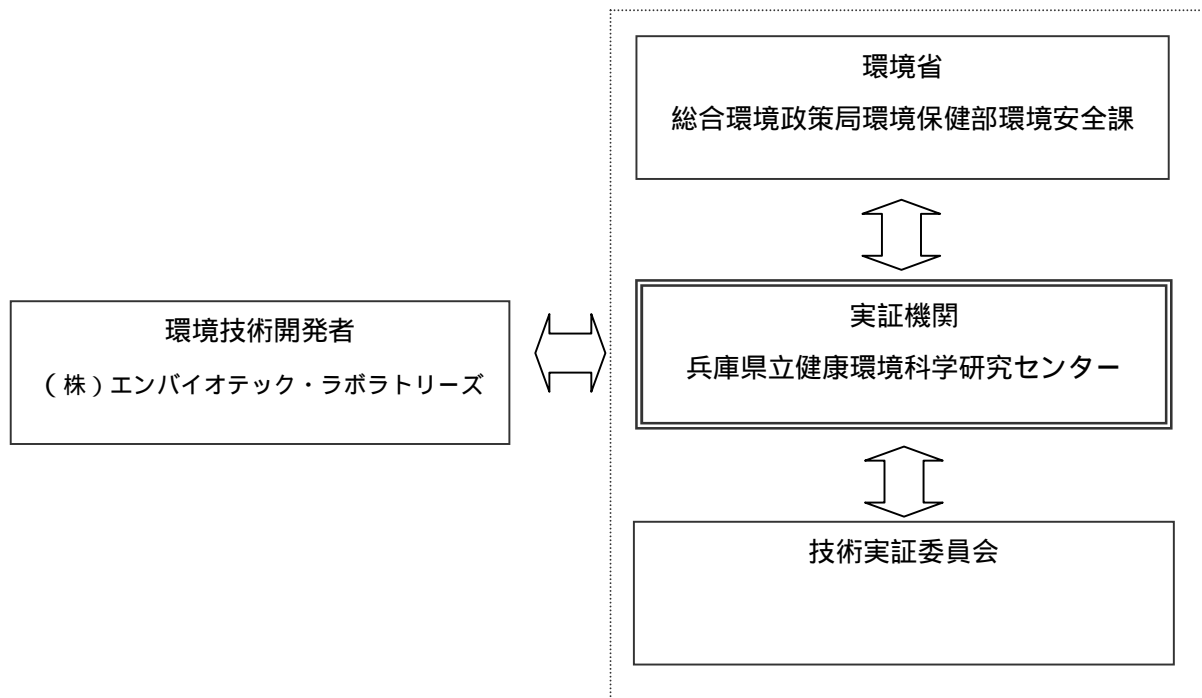


図1 実証試験の実施体制

2.3 実証試験参加者の責任分掌

実証試験参加者とその責任分掌は、下表に示すとおりである。

表2 実証試験参加者の責任分掌

実証試験 参加機関	責任分掌	参加者	
		部署	氏名
実証機関	実証試験の全体の総括責任者	安全科学部長	吉岡 昌徳
	実証試験における ELISA 法の総括責任者	主任研究員	古武家 善成
	実証試験における ELISA 法担当者	研究員	北本 寛明
	実証試験における機器分析の総括責任者	研究主幹	中野 武
	実証試験における機器分析担当者	主任研究員	古武家 善成
	実証試験における機器分析担当者	主任研究員	藤森 一男
	実証試験における機器分析担当者	主任研究員	松村 千里
	実証試験における機器分析担当者	主任研究員	吉田 光方子
	実証試験における機器分析担当者	主任研究員	鶴川 正寛
	実証試験における品質管理・内監の総括責任者	企画情報部長	辻 正彦
	実証試験における品質管理・内監担当者	主任研究員	池沢 正
	実証試験における品質管理・内監担当者	課長補佐	喜多 博子
	実証試験における品質管理・内監担当者	主任研究員	岡田 泰史
環境技術開発者	実証対象製品の提供	開発本部	奥山 亮
	実証対象製品の取扱説明書等の提供	開発本部	奥山 亮
	実証試験実施上の参考情報の提供	開発本部	奥山 亮

3. 実証試験の対象とする化学物質簡易モニタリング技術の概要

3.1 実証対象技術の原理

この実証対象製品は、申請者が開発した PCB#118 に対する特異的なモノクローナル抗体を応用した、環境中（対象環境媒体：土壌，生物）の PCB 測定 ELISA キットである。

この ELISA キットの反応原理は競合反応（PCB 濃度が高い試料では吸光度が低く，PCB 濃度が低い試料では吸光度が高い）で、マイクロプレート（96 ウェル）を使用したキットである。

3.2 実証対象製品のデータ

環境技術開発者より提出された実証対象製品のデータは、下表に示すとおりである。

表 3-1 実証対象製品のデータ 1

項目	記入欄
製品名	PCB EIA System
型番	RPN5949
販売・製造元	販売：アマシャムバイオサイエンス（株） 製造：（株）エンバイオテック・ラボラトリーズ
重量（キット一式，g）	約 500g
価格（円）	98,000 円
分析対象物質	PCB
対象環境媒体	水質・底質・生物・その他（土壌）
利用用途	食品・土壌中の PCB スクリーニング
標準試薬・種類	4-methoxy-3,3',4-trichlorobiphenyl 付属（調整済/調整要）
操作環境（室温）	15 ~ 35 （室温）
製品保管条件	2~8 （冷蔵保存）
製品保証期間	製造後 6 ヶ月間
同時測定数（最多）	42 試料（2 重測定）
測定時間	1.5 時間（前処理時間除く）

表 3-2 実証対象製品のデータ 2

項目	記入欄
1. 基本的な性能	
測定範囲	6.5~250 μ g/L (最終 DMSO 検液中の PCB118 濃度として) (添付資料: 付録 2)
検出下限および定量下限	検出下限: 6.5 μ g/L 定量下限: 6.5 μ g/L
繰返し再現性	標準偏差: 1.7~5.0, 変動係数: 2.1~8.9% (同一ロットのキットを用いて, n=8 にて 3 濃度の試料測定)
日間再現性	標準偏差: 2.9~9.7, 変動係数: 11.6~16.5% (同一ロットのキットを用いて, 6 日間 3 濃度の試料測定)
期間再現性	標準偏差: 3.2~10.7, 変動係数: 10.6~12.5% (同一ロットのキットを用いて, 製造より 0 ヶ月, 3 ヶ月, 6 ヶ月後に 2 濃度の試料測定)
プレート間再現性	標準偏差: 1.9~3.6, 変動係数: 7.2~9.1% (同一ロットのキットを用いて, 2 濃度の試料測定)
交差反応性	交差率: 0.88~15.2% (PCB #28, #31, #33, #66, #70, #105, #110)
その他	
2. 実用的な性能	
回収特性	前処理後試料における添加回収試験にて 78.4~112%の回収率 (魚試料)
測定精度等	機器分析との相関: 生物(魚)試料 $R^2 = 0.96$, n=20 土壌試料 <高濃度試料> $R^2 = 0.99$, <低濃度試料> $R^2 = 0.94$
その他	
試験責任者	奥山 亮
試験年月日	平成 14 年~平成 16 年 7 月 30 日

以下の項目については、付録 1~3 に添付する。

- 取扱説明書(付録 1)
- 自社による性能試験結果(付録 2)
- 参考となるその他の文書やデータ等(付録 3)

4. 実証試験のデザイン

4.1 実証試験の期間

実証試験の期間は、平成 17 年 1 月とする。また、その期間のスケジュールは下表に示すとおりである。

表 4 実証試験のスケジュール（予定）

	11 月	1 月			
	4-5 週	2 週	3 週	4 週	5 週
実証試験計画の策定					
対象技術の選定，計画書案作成	○				
実証試験計画書策定，承認	○				
実証試験の実施					
測定範囲の検討			○		
検出限界および定量限界の検討			○		
繰返し再現性の検討			○		
日間再現性の検討			○		
期間再現性の検討			○		
プレート間再現性の検討			○		
交差反応性の検討				○	
回収特性の検討				○	○
測定精度の検討				○	○
内部監査の実施					○
実証試験結果中間報告		○			
技術実証委員会の実施	○	○			

4.2 実証試験の内容

実証試験項目の内容は、表 5 のとおりである。

表 5 実証項目の内容

項目	内容
1. 基本的な性能	
測定範囲	市販標準物質で調製した指定濃度系列について、繰返し操作により平均値、変動等を求め、提出された測定範囲の妥当性を検討する。
検出下限および定量下限	市販標準物質で調製した指定濃度系列の下限付近の濃度について、繰返し操作による標準偏差から検出下限および定量下限を求め、提出された下限値の妥当性を検討する。
繰返し再現性	市販標準物質で調製した指定濃度系列の中央付近の濃度について、繰返し操作により平均値、変動等を求め、再現性を検討する。
日間再現性	市販標準物質で調製した指定濃度系列について、異なる日に、繰返し操作により平均値、変動等を求め、再現性を検討する。
期間再現性	市販標準物質で調製した指定濃度系列について、一定期間前後で、繰返し操作により平均値、変動等を求め、再現性を検討する。
プレート間再現性	市販標準物質で調製した指定濃度系列について、異なるロットや異なるプレートで、繰返し操作により平均値、変動等を求め、再現性を検討する。
交差反応性	市販標準物質および類似物質で調製した指定濃度系列について、吸光度曲線を求め、交差反応性を検討する。
2. 実用的な性能	
回収特性	市販標準物質で調製した指定濃度系列の中央付近の濃度について、環境試料を用いた回収試験を行い、回収特性を検討する。
測定精度	濃度未知の環境試料を ELISA キットおよび機器分析法で測定し、結果の比較から、測定精度や環境試料への適用可能性を検討する。

4.3 実証対象製品の受け入れと管理

(1) 実証対象製品（ELISA キット）の受け入れ

ELISA キット受領時の状態について、搬入者の立ち会いの元に、受領の記録を ELISA キット管理表（様式 1）に記入し、以下の事項を確認する。

- 管理表と ELISA キットの品名、数量が一致していること。
- ELISA キットの搬送が適切に取り扱われていること。
- ELISA キットに不適合又は疑義を発見したときは、搬入者と協議し適切な処置をとる。

(2) ELISA キットの管理

- ELISA キットは、変質しないように、取扱説明書に記載された保管条件で適切に保管・管理する。
- ELISA キットの分轄を行う場合は、汚染や品質低下のない方法で行い、識別番号等必要な表示を行うとともに、分轄の年月日その他必要な事項を管理表に記録する。

ELISA キット管理表（様式1）

受領年月日 _____ 年 _____ 月 _____ 日 _____ 時 _____ 分 搬入者 _____

番号（管理番号） _____ - _____

メーカー名 _____

品名 _____

Lot . No. _____

搬入時確認事項

包装等に破損がない

保管場所 _____

保管温度（ _____ ）

保管温度 _____

搬入時の温度管理

使用期限

その他異常なし

受領者 _____

（移動・分轄等の記録）

4.4 実証試験の方法

基本的な性能試験および実用的な性能試験において、以下の操作は共通である。

a. 製品の操作

製品の操作にあたっては、製品の取扱説明書を遵守するとともに、「化学物質簡易モニタリング実証試験 品質管理マニュアル」(付録4)の試験操作手順(一般的な事項)に従って行う。

b. 検量線作成用標準溶液の調製

キットに付属する標準物質を用い、キットが指定する希釈濃度系列(以下、指定濃度系列)を作成する。

c. 吸光度の測定

指定濃度系列および各試験用試料溶液の吸光度は、マイクロプレートリーダー(バイオ・ラド社マイクロプレートリーダー モデル680)で測定する。

d. 検量線の作成

プレート毎に同時に測定したブランク(添付の希釈液等)および標準溶液指定濃度系列の吸光度(3重測定の平均値)から、キットの指示に従い検量線を作成する。

e. 実測濃度の算出

d.で作成した検量線を用いて、各試験用試料溶液の吸光度から各実測濃度を算出する。

(1) 基本的な性能試験

実証対象製品の基本的な性能を検討するため、製品仕様の信頼性等の観点から市販標準品(以下、市販標準物質)で調製した試験用試料溶液を用いた実証試験を行う。

● 試験用試料溶液の調製

市販標準物質 PCB #118 (ACCU Standard 社製 2,3',4,4',5-PeCB) を用いて、DMSO を希釈溶媒として、試験用試料溶液を作成する。

標準溶液指定濃度系列および試験用試料溶液の調製濃度は、表 6 のとおりである。

表 6 標準溶液指定系列および試験用試料溶液

試験項目	物質名	試料名試料溶液調製濃度 (µg/L)
標準溶液指定濃度系列	キット付属 PCB #118 擬似標準品	0, 10, 25, 100, 250, 1000
測定範囲 日間再現性 期間再現性 プレート間再現性	PCB #118	0, 10, 25, 100, 250, 1000
検出下限および定量下限	PCB #118	10
繰返し再現性	PCB #118	25
交差反応性	PCB #77	0, 10, 25, 100, 250, 1000
	PCB #105	0, 10, 25, 100, 250, 1000
	2,2',4,4',5, 5'-HeBB	0, 10, 25, 100, 250, 1000

測定範囲

市販標準物質で調製した指定濃度系列の試料溶液について、各調製濃度につき 3 重測定を行い、3 個の吸光度それぞれから求めた測定濃度より、平均値、標準偏差、変動係数を求める。

これを基に、調製濃度と実測濃度との比較、指定された測定範囲の妥当性について検討する。

検出下限および定量下限試験

市販標準物質で調製した指定濃度系列の下限付近の 1 濃度を 8 回測定し、3 重測定の平均吸光度から算出した 8 個の測定濃度より標準偏差 (SD) を求める。求めた SD から得られ 3SD および 10SD をそれぞれ検出下限および定量下限とし、申請データと比較検討する。

繰返し再現性試験

市販標準物質で調製した指定濃度系列の中央付近の1濃度を3重測定で8回測定し、3重測定の平均吸光度から算出した8個の測定濃度より平均値、標準偏差、変動係数を求める。

求めた変動係数から、繰返し再現性について製品仕様の妥当性を検討する。

日間再現性試験

(同一測定者が)1週間の異なる3日間において、同一ロットの異なるプレートを用いて「測定範囲試験」と同じ測定操作・検討を行う。各調製濃度について得られた平均値、標準偏差、変動係数をプレート毎に求め、3日間の結果の比較から製品仕様の妥当性を検討する。

期間再現性試験

1ヶ月以上離れた製造年月日の2枚のプレートを用いて、同時に(同日に)「測定範囲試験」と同じ測定操作・検討を行う。各調製濃度について得られた各プレートの測定濃度の平均値、標準偏差、変動係数を求め、その結果の比較から製品仕様の期間再現性の妥当性を検討する。

プレート間再現性試験

同一ロット2プレートおよび異なるロット1プレートの3プレートを用いて、(同一測定者が)同時に(同日に)「測定範囲試験」と同じ測定操作・検討を行う。各調製濃度について得られた3プレート間の平均値、標準偏差、変動係数の比較から、同一ロットおよび異なるロットでのプレート間再現性について製品仕様の妥当性を検討する。

交差反応性試験

市販標準物質および類似物質を用いて、指定濃度系列で吸光度曲線(吸光度は3重測定の平均値から求める)を描き、吸光度曲線から類似物質の50%発色阻害濃度を求める。(市販標準物質の50%阻害濃度/類似物質の50%阻害濃度)×100(%)で交差率を求め、類似物質の交差反応性を検討する。

類似物質に関して、指定濃度系列のみでは50%発色阻害濃度が求められない場合は、50%発色阻害濃度が得られるように高濃度側を加えた濃度系列を作り、試験をやり直す。予想される高濃度側の濃度範囲が実用的でない場合には、20または10%阻害濃度で代用する。

(類似物質の交差反応性に関しては、申請者の交差反応性に関するデータを参考とする。)

(2) 実用的な性能試験

実証対象製品の実用的な性能を検討するため、環境試料への適用性等の観点から環境試料試験による実証試験を行う。

回収特性試験

グラスファイバーフィルター(孔径 1 μ m に準拠)を用いて、河川水をろ過したろ液を原水とし、それに指定濃度範囲の中央付近の 1 濃度となるように市販標準物質を添加するとともに、妨害物質として標準フミン酸を一定濃度添加して、試験用試料溶液を調整する。試験用試料溶液の調製濃度は、表 7 のとおりである。

調製した試験用試料溶液について、3 重測定して平均値、標準偏差、変動係数、回収率を求め、フミン酸存在下での製品の回収特性を検討する。

表 7 試験用試料溶液

物質名	試料名および調製濃度 (mg/L)
分析対象物質：PCB	0.025
妨害物質：フミン酸ナトリウム	1
	5
	10
	50

測定精度試験

複数(3 地点)の河川地点から得られた河川水について、「別添 前処理法」に示す方法で処理し PCB を測定する。

同一試料について、所定のマニュアル(前処理法を含む)に従って機器分析を行い、ELISA と機器分析の実測値を比較し(相関係数および回帰式)、検討する。

また、操作簡便性(測定時間、操作ステップ数、標準溶液・反応液の調製の難易)について、環境試料への適用性の観点から検討する。

5. データの品質管理

(1) 測定操作の記録

- a. 実証試験過程で入手，作成した文書（デジタル画像を含む）および記録については適切に管理・保管する。
- b. 実証項目の試験は，「品質管理マニュアル」（付録 4）に従って行い，その分析作業台帳および分析機器の点検事項等は，記録に残す。

(2) データ処理の管理

- a. 試験データの計算や転記について，当該実施者以外の監督者によるチェックを行い，記録を残す。
- b. 試験データのファイルはコンピュータと独立したメモリーチップに保存し，関係のない者がデータファイルにアクセスできないようにする。
- c. データファイルの紛失の可能性があるときは，バックアップを取りデータを保護する。

6. データの管理，分析，表示

6.1 データ管理

本実証試験から得られる以下のデータは，「化学物質簡易モニタリング実証試験 品質管理マニュアル」に従って管理するものとする。

6.2 データ分析と表示

本実証試験で得られたデータについては，必要に応じ統計分析の処理を実施するとともに，使用した数式を実証試験結果報告書に記載する。

7. 評価

本実証試験で得られたデータの品質監査は，「化学物質簡易モニタリング実証試験 品質管理マニュアル」（別資料）に従って行うものとする。

実証試験が適切に実施されていることを確認するために実証試験の期間中に内部監査を実施し，兵庫県立健康環境科学研究センター所長に報告する。

河川水試料の前処理法

河川水試料 1L を最終的に DMSO(ジメチルスルホキシド) 1mL に転溶し、PCB EIA System に用いるために、以下の方法により河川水からの PCB 抽出を行なう。

<機器・試薬等>

高温槽付窒素吹付け濃縮器：Turbo Vap (Zymark 社)

1L 分液ロート

専用濃縮用チューブ

200mL 三角フラスコ

ガラスロート

濾紙：5A 125mm (ADVANTEC 社)

n-ヘキサン(残留農薬・PCB 試験用以上)

メタノール(残留農薬・PCB 試験用以上)

DMSO(ジメチルスルホキシド)(生化学用)

硫酸ナトリウム(農薬分析用以上)

高純度窒素ガス

<方法>

河川水 1L を 50mL n-ヘキサンを加えて振とう抽出を 2 回行なう。このとき、河川水試料の入っていた容器は、メタノール数 mL で洗浄し、その洗浄液も試料水と合わせて抽出する。抽出後のヘキサン溶液は、無水硫酸ナトリウムで脱水後、40 恒温水槽内で高純度窒素ガス吹付けにより、1mL まで濃縮する。さらに、40 加熱のみでごく微量まで濃縮後、DMSO 0.5mL を濃縮用のチューブ壁下部を洗うように添加し、再び 40 恒温水槽内で高純度窒素ガス吹付けを行い、ヘキサンを十分に除去する。ヘキサン液の濃縮時に乾固させないように注意する。

この後、DMSO を添加して 1mL とし、EIA 反应用試料とする。

<前処理の流れ>

1L 分液ロート

- ← 1L 河川水試料
- ← 数 mL 河川水試料の入っていた容器のメタノール洗浄液
- ← 50mL n-ヘキサン

振とう 10 分間

↓
静置

↓
水相

↓
ヘキサン相

↓
もとの試料採取瓶

↓
200mL 三角フラスコ

↓
先ほどの 1L 分液ロートにもどす

- ← 数 mL 河川水試料の入っていた容器のメタノール洗浄液
- ← 50mL n-ヘキサン

振とう 10 分間

↓
静置

↓
水相は捨てる

↓
ヘキサン相

↓
先ほどの 200mL 三角フラスコ

- ← 無水硫酸ナトリウム

↓
脱水

↓
200mL 窒素吹付け濃縮用チューブ(ターボバップチューブ)

↓
40 加温しながら 1mL まで高純度窒素吹付け濃縮

↓
100 μL 程度まで穏やかに 40 加温濃縮

- ← 0.5mL DMSO

↓
ヘキサンが十分なくなるまで、40 加温しながら高純度窒素吹付け濃縮(30 分以上)

↓
DMSO 量を合計 1mL に再調整し、試験試料とする

EnBio PCB EIA system

EnBio PCB EIA system

Code RPNJ412

96 wells

STORAGE:

Store at 2~8°C

EXPIRY:

The expiry date is stated on the package and will be at least 4 weeks from the date of dispatch.

Warning

For research use only. Not recommended or intended for diagnosis of disease in humans or animals. Do not use internally or externally in humans or animals.

製品の仕様はやむを得ず変更される場合がありますので、あらかじめご了承ください。



	ページ
1. はじめに.....	2
2. キットの特長.....	2
3. 測定原理 (競合 EIA 法)	2
4. アッセイシステムの内容.....	3
5. キット使用上の注意.....	3
6. アッセイ方法.....	4
(1) 必要な器具および試薬.....	4
(2) 標準液の調整.....	4
(3) HRP 標識競合体溶液の調整.....	5
(4) 混合液 (標準液と HRP 標識競合体溶液) の調整.....	5
(5) Wash buffer の調整.....	5
(6) 測定操作手順.....	6
7. 測定値の算出法.....	6
(1) 算出例.....	6
(2) 総 PCB 濃度の推定.....	7
8. 土壌試料への適用.....	7
(1) 試料前処理例.....	7
(2) 適用例: GC-ECD との相関性.....	8
9. 廃油 (絶縁油) 試料への適用.....	8
(1) 試料前処理例.....	8
(2) 適用例.....	9
10. システムの性能.....	10
(1) 交差反応性.....	10
(2) 標準品.....	11
(3) 測定感度.....	11
(4) 再現性.....	11
(5) Precision profile.....	12
11. トラブルシューティングガイド.....	13
(1) 吸光度が低すぎる.....	13
(2) 吸光度が高すぎる/zero standard 値が高すぎる.....	13
(3) 測定の精度、再現性が良くない.....	13

1. はじめに

本キットでは、PCBの異性体の一つである、PCB #118に対して特異的に反応するモノクローナル抗体を用いています。PCB #118は、PCB製品であるカネクロル等の主要異性体の1種であることから、本キットを用いてPCBの総濃度を推定することが出来ます。

2. キットの特長

- PCB #118に対して特異的に反応するモノクローナル抗体を利用しているため、試料中のPCBを特異的に検出・測定することが出来ます。
- 本キットにはPCB #118と同等の反応性を示す擬似標準品(3,3',4'-trichloro-4-methoxybiphenyl)を添付しており、PCB #118濃度に対応した標準曲線を作成することが可能です。
- 96穴マイクロタイタープレートを利用しているため、多数のサンプルの同時測定が可能です。1キットで最大40検体までアッセイできます(2重測定の場合)。
- アイソトープを利用しない為、特殊な装置、設備は不要です。
- プレートはストリップタイプ(8 wells/strip)となっていますので、分割使用が可能です。
- 6.5~250 ng/mlのレンジでPCB #118を測定することが出来ます。
- 抗体の交差反応性を利用して、本キットによる測定値から試料中のおおよそのPCB総濃度を推定することが出来ます。

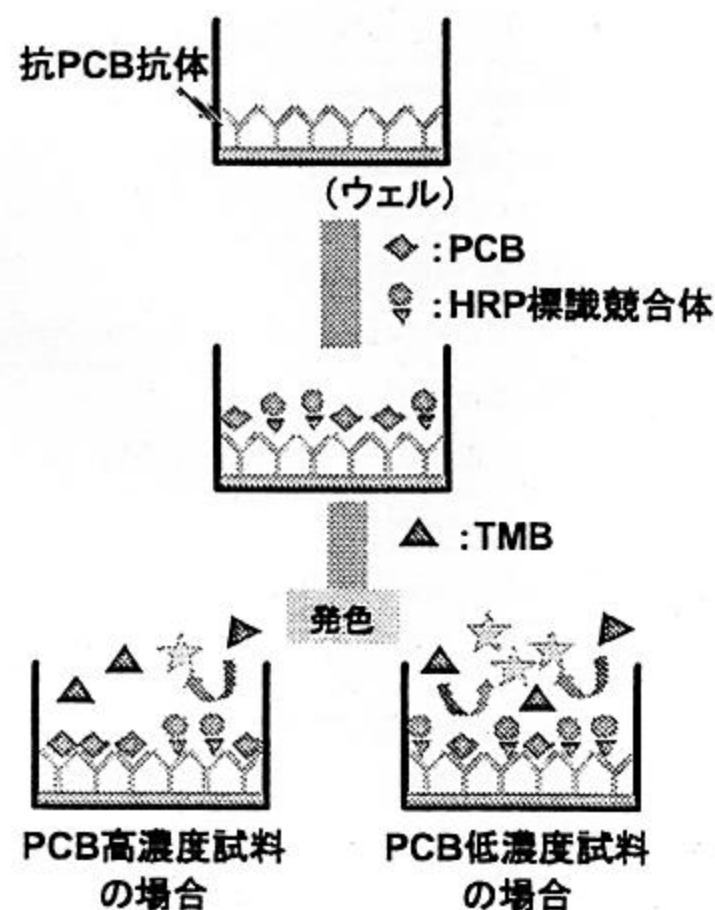
3. 測定原理(競合 EIA 法)

PCB #118に対して特異的に反応するモノクローナル抗体を用いた競合 EIA 法です。

抗 PCB 抗体を固相化してある 96 穴マイクロタイタープレートのウェルに PCB 含有試料(DMSO 溶液)および HRP 標識競合体の混合液を添加し、競合反応させます。

洗浄後、HRP の基質であるテトラメチルベンジジン(TMB)を加え酵素反応を行い、反応液の吸光度を 450nm で測定します。この際、試料中の PCB 濃度が高くなるにつれ、抗体に結合できる HRP 標識競合体が少なくなるため、発色量が減少していきます。

実際の測定では、PCB を含んでいないブランク試料と測定試料との吸光度の比から、試料中の PCB 濃度を定量することが出来ます。



4. アッセイシステムの内容

このアッセイシステムには、以下に示すものが含まれています。

注意：全ての試薬類は、室温に戻してからご使用ください。使用後は速やかに2~8℃にて保存してください。

No.	品名	容量
①	Antibody coated microtiter plate 抗 PCB #118 抗体固相化マイクロタイタープレート。アッセイに必要な数のストリップ (8 wells/strip) を取り出して使用してください。残りのストリップは添付の plate seal で密封し、袋内に戻して2~8℃にて保存してください。開封後は30日以内に使用してください。	96 well, 12 strip
②	PCB 118 standard 3,3',4'-trichloro-4-methoxybiphenyl, 1,000 ng/mL (PCB #118 換算値) DMSO 溶液。使用前に室温にて完全に融解させ、DMSO で希釈して使用します。希釈系列の調整法は溶液の調整の項目 (p.4) を参照してください。	300 μ L
③	HRP conjugate dilution buffer そのまま使用します。	7mL
④	Competitor-HRP conjugate concentrate HRP 標識競合体原液。使用前に HRP dilution buffer で希釈して使用します。希釈法は溶液の調整の項目 (p.5) を参照してください。	70 μ L
⑤	Wash buffer concentrate 10 倍濃縮洗浄原液。蒸留水あるいは脱イオン水にて希釈して使用します。希釈法は溶液の調整の項目 (p.5) を参照してください。	30mL
⑥	TMB substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine。そのまま使用します。	22mL
⑦	Stop solution 1 N 硫酸。そのまま使用します。	7mL
⑧	Plate seal 必要に応じて、適宜切り取って使用します。	2 枚

5. キット使用上の注意

- ・ PCB は化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (化審法) により第一種特定化学物質に指定されており、その取り扱いには厳しい規制が設けられています。本キットを用いた測定は、PCB 取り扱い可能な設備内で実施してください。
- ・ 関連法規に則り、測定の際に生じる廃液、廃棄物等は厳重な管理をしてください。
- ・ 本製品は、試験研究用に製造されたものです。人、動物の診断目的での使用は絶対にしないでください。また、人体への投与は絶対にしないでください。
- ・ 実験中は適切な保護服を常に着用し、試薬が皮膚や目等に直接触れたり体内に入ることのないよう注意深く取り扱ってください。万一、そのようなことが起きた場合には直ちに大量の水で洗浄するなどし、医師の指示を受けてください。
- ・ 使用する前にラベル表示(品名)を確認してください。
- ・ 試薬取り扱いの際は、新しいチップ・ピペット等を利用してください。
- ・ サンプル、試薬類は分注する前によく攪拌してください。また溶液類には蛋白質、活性剤が含まれているものもありますので、激しい攪拌による過剰な泡化は避けてください。
- ・ 全操作を通じて、プレートの底面や各ウェルの上部には触れないようにしてください。プレート底面の汚れやコンタミネーションにより測定誤差の原因になります。

- ・ スタンダードおよびサンプルは必ず 2 重以上で測定してください。
- ・ アッセイ毎に検量線を作成してください。
- ・ 試薬類のプレートへの分注は、20 分以内で行ってください。
- ・ 洗浄操作は特に重要ですので、必ず完全に、かつ各ウェルとも同じ様に洗浄してください。プレートウォッシャーを使用する際は、使用前にノズルの動きをチェックしてから始めてください。御使用になるプレートウォッシャーの機種によっては、洗浄が不十分になることもありますので、その時は洗浄回数を増やしてください。
- ・ 異なったロットのキット間での試薬の使い回しはしないでください。
- ・ 試薬を加える順番、インキュベーション時間は方法の欄に書かれている内容に従ってください。

6. アッセイ方法

アッセイを始める前に必ずお読みください。

注意 1：操作は全て PCB 取り扱い可能な設備内にて行い、測定の際に生じる廃液、廃棄物等は関連法規に則り厳重な管理をしてください。

注意 2：キットに含まれる全ての試薬を室温に戻してからアッセイを始めてください。特に、TMB substrate は必ず室温に戻してから使用してください。

(1) 必要な器具および試薬

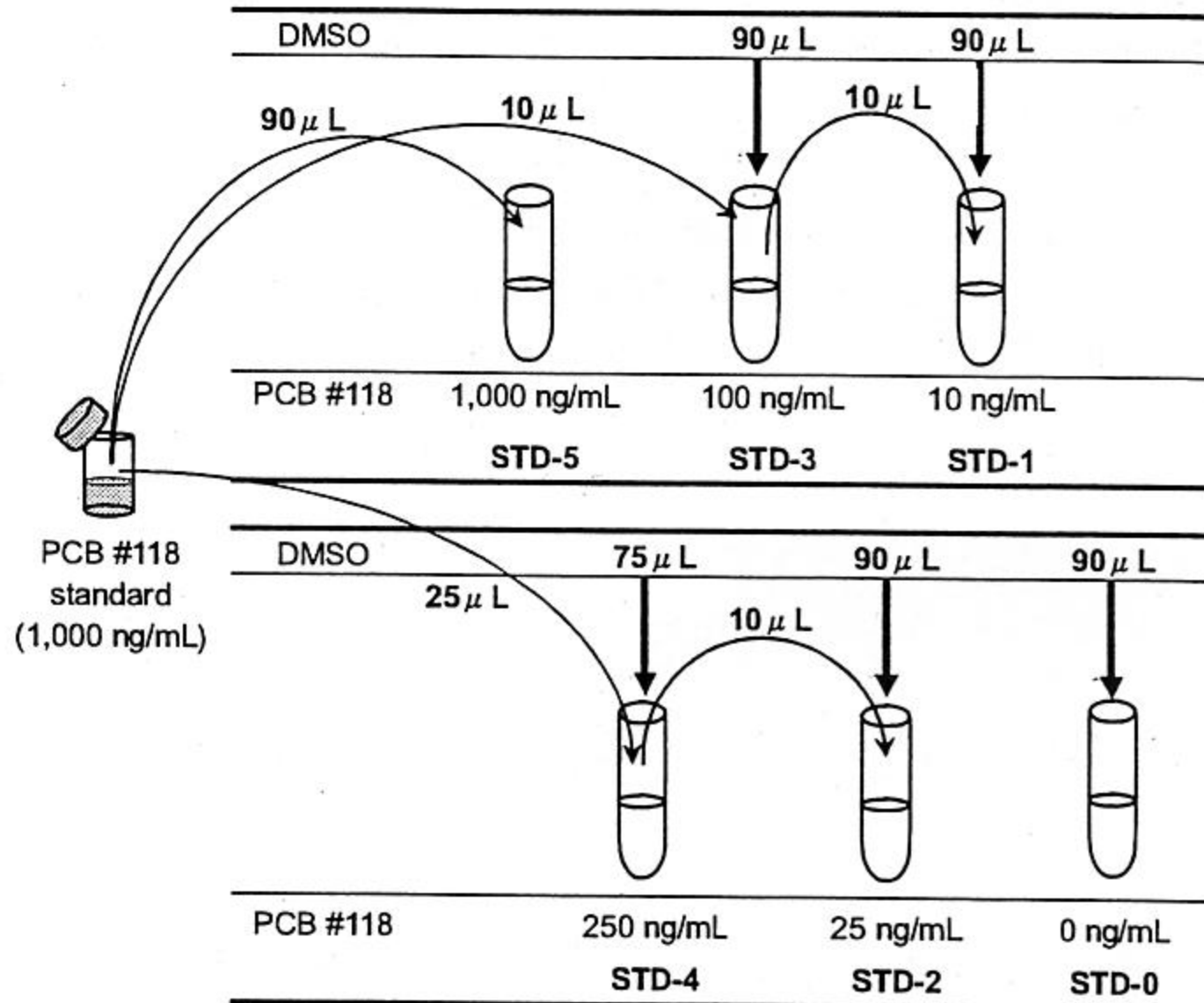
- ・ マイクロピペットおよびチップ (10~100 μ L、100~500 μ L)
- ・ ガラス試験管 (標準液・試料希釈、及び標準液・試料と HRP 標識競合体の混合用)
- ・ メスシリンダー (300mL)
- ・ 蒸留水あるいは脱イオン水
- ・ マイクロプレート用振とう器
- ・ プレートウォッシャー
- ・ ジメチルスルホキシド (DMSO, 生化学用)
- ・ 450nm で測定可能なプレートリーダー

(2) 標準液の調整

注意：標準液調整は、全てガラス製の試験管にて行ってください。プラスチック製の容器で長時間放置した場合、溶液中の PCB が容器壁面に吸着し、測定結果に影響を与える可能性があります。

- ① PCB #118 standard を室温で完全に融解し、試験管ミキサー等で攪拌します。
- ② PCB #118 standard を DMSO で希釈し、1,000 ng/mL, 250 ng/mL, 100 ng/mL, 25 ng/mL, 10 ng/mL, 0ng/mL の希釈系列を調整します。次頁の例は、2 重測定を行った場合、測定 2 回分に相当します。
- ③ 調整した標準液は、試験管ミキサー等で十分攪拌しておきます。
- ④ 調整した標準液の希釈系列を再利用する場合は、蓋付のガラスバイアルに移し、密閉して 2~8°C にて保存してください。その場合、30 日以内にご使用ください。

標準液調整例(2重測定で2回測定分)



(3) HRP 標識競合体溶液の調整

注意：溶液を攪拌する際は、激しく攪拌しすぎて泡化しないよう注意してください。

HRP conjugate dilution buffer 6mLに Competitor-HRP conjugate concentrate を 60 µL 添加し、試験管ミキサー等で軽く攪拌してください。プレートのスプリットを分割使用する場合は、使用量に応じて各試薬量を調整してください（例：4スプリットを使用する場合、2mLの HRP conjugate dilution buffer に 20 µL の Competitor-HRP conjugate concentrate を添加）。

(4) 混合液(標準液と HRP 標識競合体溶液)の調整

注意：混合液の調整は、標準液の調整同様、全てガラス製の試験管を用いてください。

- ① (2)にて調整した標準液または測定試料と(3)にて調整した HRP 標識競合体溶液とを 1:3 の割合で混合し、試験管ミキサー等でよく攪拌します（2重測定の場合は、それぞれ、30 µL と 90 µL を混合）。
- ② 混合液を調整後は、なるべく速やかにプレートへの分注を行ってください。混合後 2 時間までは測定値に影響を与えないことを確認していますが、長時間放置しておくと測定結果に影響を与える可能性があります。

(5) Wash buffer の調整

- ① Wash buffer concentrate (10 倍濃縮洗浄原液) の全量を 300mL のメスシリンダーに移し、蒸留水あるいは脱イオン水を加えて最終容量を 300ml に調製してください。
- ② メスシリンダーにパラフィルム等で蓋をし、転倒混和等でよく攪拌してください。
- ③ 調製後は 2~8°C で保存し、30 日以内にご使用ください。

(6) 測定操作手順

- ① 標準品および測定しようとしているサンプル数に十分な strip (8wells/strip) を用意します。各測定は2重以上で行ってください。
- ② (4)にて調整した標準液と HRP 標識競合体溶液との混合液をそれぞれのウェルに 50 μ l ずつ加えます。
- ③ 同様に、(4)にて調整した測定試料と HRP 標識競合体溶液との混合液をそれぞれのウェルに 50 μ l ずつ加えます。
- ④ プレートをシールで覆い、プレート振とう器を用いて、サンプル溶液が飛散してシールにつかない程度に緩やかに振とうしながら、室温 (20~28 $^{\circ}$ C) で 30 分反応させます。
- ⑤ 反応後、プレートウォッシャーを用いて、(5)にて調整した Wash buffer で 3 回洗浄してください。
- ⑥ 最後の洗浄操作後は、裏返したプレートをきれいな紙タオル等に軽く叩きつけるようにして、残っている液を完全に取り除きます。
- ⑦ 全てのウェルに 50 μ L の TMB substrate を加えます。
- ⑧ 室温(20~28 $^{\circ}$ C)で正確に 20 分間静置します。振とうしないでください。サンプル数が多い場合は、各サンプルの反応時間が一定になるようにご注意ください。
- ⑨ 全てのウェルに 50 μ L の Stop solution を加えます。
- ⑩ 10 分以内に 450nm の吸光度を測定します。

7. 測定値の算出法

標準曲線を元に、試料中の PCB 濃度を算出します。

注意 1 : 標準曲線は、測定ごとに作成してください。

注意 2 : 定量範囲を越えた高濃度の試料は、DMSO にて適宜希釈して再度測定しなおしてください。その場合、10~20 倍の段階希釈液 (例 : x 10, x 100, x 1,000 等) で行うことにより、定量範囲内に収まります。

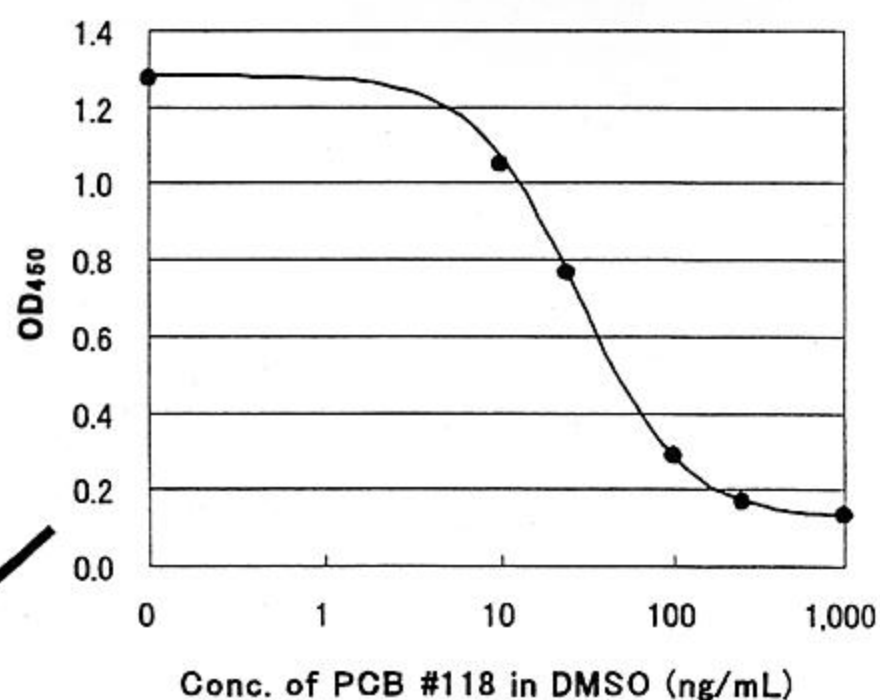
(1) 算出例

- ① 標準曲線を 4 parameter logistic model にて回帰した例を示します。

Four parameter logistic model

$$Y = \left(\frac{A - D}{1 + \left(\frac{X}{C} \right)^B} \right) + D$$

X : サンプル中 (DMSO 溶液) の PCB 濃度
Y : サンプルの吸光度 (OD₄₅₀)
A : Zero standard (0ng/mL) における吸光度
B : 変曲点における曲線の傾き
C : 50%阻害の起こる PCB 濃度
D : PCB 飽和濃度における吸光度



$$Y = \left(\frac{1.29 - 0.128}{1 + \left(\frac{X}{28.1} \right)^{1.46}} \right) + 0.128$$

* SOFTmax (Molecular Devices Corp.) にて解析

- ② サンプルの測定値を回帰式に代入して得られる濃度に、希釈倍率、濃縮倍率を掛け合わせるにより、試料中の PCB 濃度を算出します。

<算出例>

- 20g の試料から PCB を抽出し前処理後、100 μ L の DMSO に置換。

- DMSO にて 50 倍に希釈し、EIA にて測定。
- 標準曲線の回帰式を次のように変形する。 $X=C \times ((A-Y)/(Y-D))^{(1/B)}$
- サンプルの吸光度 (OD₄₅₀) を回帰式に代入 (例: サンプル吸光度=0.621)
→ $X=28.1 \times ((1.29 - 0.621)/(0.621 - 0.128))^{(1/1.46)} = 34.6 \text{ ng/mL}$
- 希釈倍率および濃縮倍率を掛け合わせる
→ $34.6 \times 50 \div 200 = 8.7 \text{ ng/g}$

(2) 総 PCB 濃度の推定

本 EIA は、PCB #118 に対する反応性を 100 とすると、カネクロルに対して以下のような反応性を示します。

PCB products	% CR
KC-300	3.87 (1/26)
KC-400	7.36 (1/14)
KC-500	9.14 (1/11)
KC-600	1.69 (1/59)

したがって、EIA によって得られた測定値を 11 倍することで KC-500 換算の PCB 濃度を、14 倍することで KC-400 換算の PCB 濃度を推定することができます。また、対象となる試料に応じて、カネクロルを標準物質として標準曲線を作成することで、より精度の高い推定値を求めることができます。

8. 土壌試料への適用

(1) 試料前処理例

注意:DMSO に溶解した最終検液は、バイアルのキャップをしっかりと閉めて冷蔵保存してください。適切な保存をせずに長期間放置した場合、空気中の水分が混入し、試験結果に影響を与える恐れがあります。

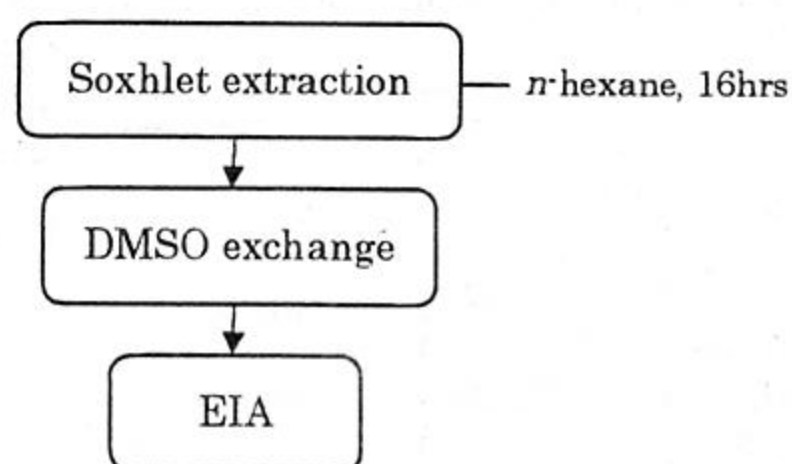


図 1 土壌試料の前処理例

(2) 適用例:GC-ECD との相関性

図 2 に示すように、PCB 汚染サイトの土壌において、汚染土壌及び浄化土壌ともに、GC-ECD との良好な相関性を示しています。

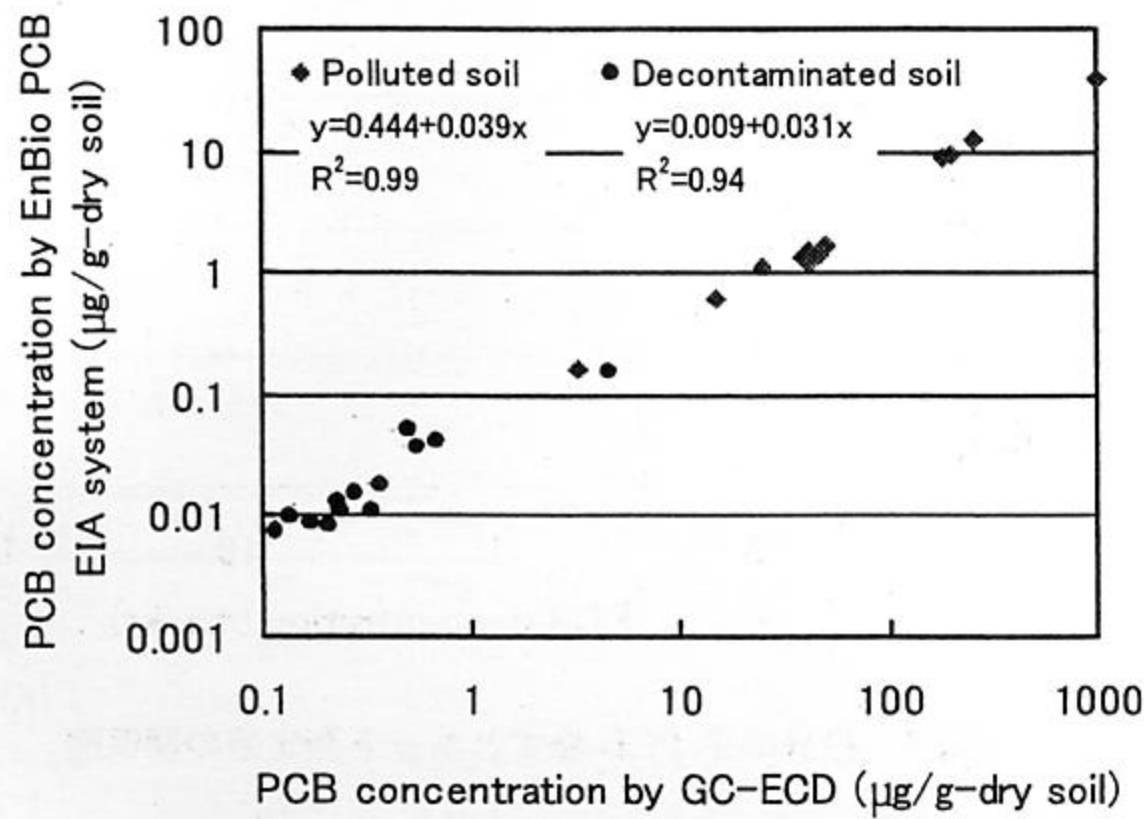


図 2 土壌試料における GC-ECD とキット測定値との相関図

From: Proceedings for 9th meeting of countermeasure for soil and groundwater contaminations, 450-453, 2003 (Japanese language)

9. 廃油(絶縁油)試料への適用

(1) 試料前処理例

注意:DMSO に溶解した最終検液は、バイアルのキャップをしっかりと閉めて冷蔵保存してください。適切な保存をせずに長期間放置した場合、空気中の水分が混入し、試験結果に影響を与える恐れがあります。

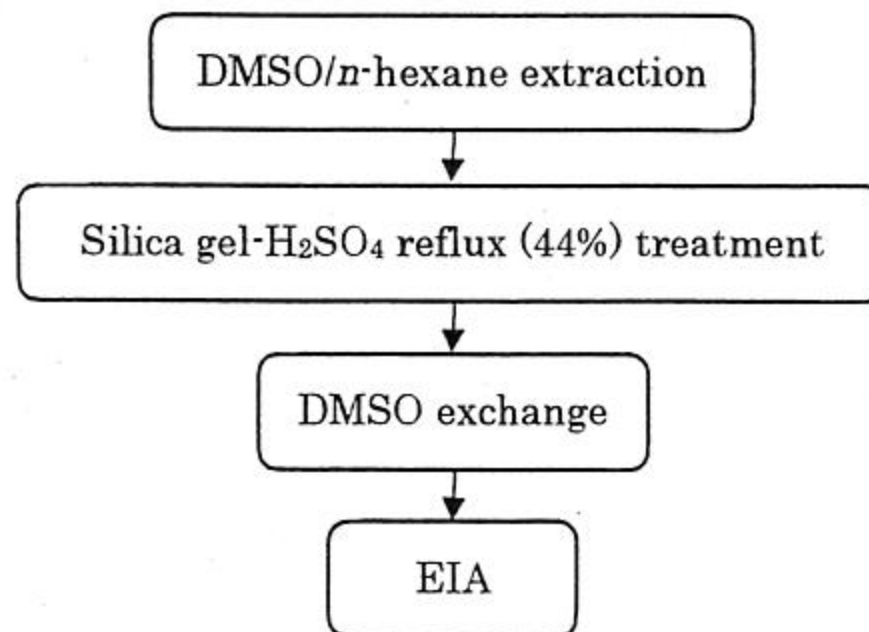


図 3 絶縁油試料における前処理例

(2) 適用例

図4に絶縁油中 PCB 濃度測定結果を示します。良好な一致が確認されています。

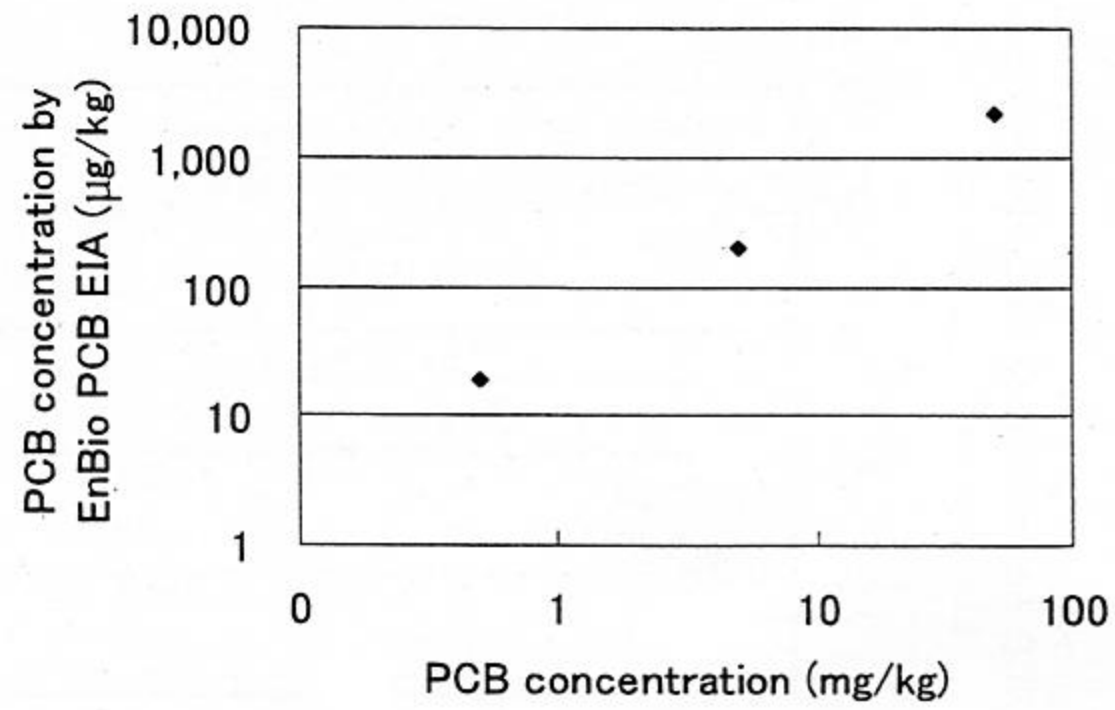


図4 絶縁油中 PCB 濃度とキット測定値の関係図

Drawn from: Organohalogen compounds, 58, 397-400, 2002

10. システムの性能

(1) 交差反応性

関連する化合物に対する交差反応性 (Cross-reactivity, CR) の確認結果を、PCB #118 に対する反応性 (100) に対する比として示しています。

Table 1 交差反応性

PCB products	% CR	Predominant congeners IUPAC #	% CR
KC-300	3.87 (42.3)	2,3-DiCB	5 < 0.1
KC-400	7.36 (80.5)	2,4'-DiCB	8 < 0.1
KC-500	9.14 (100)	2,2',5'-TriCB	18 < 0.1
KC-600	1.69 (18.5)	2,3,3'-TriCB	20 < 0.1
		2,4,4'-TriCB	28 3.5
		2,4',5'-TriCB	31 12.9
		2',3,4'-TriCB	33 2.6
		2,2',3,5'-TeCB	44 < 0.1
		2,2',5,5'-TeCB	52 < 0.1
		2,3',4,4'-TeCB	66 15.2
		2,3',4',5'-TeCB	70 14.9
		2,2',3,5',6'-PeCB	95 < 0.1
		2,2',4,5,5'-PeCB	101 < 0.1
		2,3,3',4,4'-PeCB	105 2.5
		2,3,3',4',6'-PeCB	110 0.88
		2,3',4,4',5'-PeCB	118 100
		2,2',3,4,4',5'-HexCB	138 < 0.1
		2,2',3,4',5',6'-HexCB	149 < 0.1
		2,2',4,4',5,5'-HexCB	153 < 0.1
		2,2',3,3',4,4',5'-HepCB	170 < 0.1
		2,2',3,3',4,5,6'-HepCB	174 < 0.1
		2,2',3,4,4',5,5'-HepCB	180 < 0.1
		2,2',3,4',5,5',6'-HepCB	187 < 0.1
		2,2',3,3',4,4',5,5'-OctCB	194 < 0.1
		2,2',3,3',4,4',5',6'-OctCB	196 < 0.1
		2,2',3,3',4,5,5',6'-OctCB	199 < 0.1
		2,2',3,4,4',5,5',6'-OctCB	203 < 0.1
		Other related compounds	% CR
		Biphenyl	< 0.1
		1,2-dichlorobenzene	< 0.1
		3,4-dichloroaniline	< 0.1
		3,4-dichloroanisole	< 0.1
		3,4-dichloronitro-benzene	< 0.1
		3,4-dichlorophenol	< 0.1
		3,4-dichlorotoluene	< 0.1
		1,2,3-trichlorobenzene	< 0.1
		3,4,5-trichloroaniline	< 0.1
		3,4,5-trichlorophenol	< 0.1
		2,3,7,8-TCDD	< 0.1
		2,3,7,8-TCDF	< 0.1

* 括弧内の数値は、KC-500 への反応性を 100 とした場合の交差反応性

Coplanar PCBs	IUPAC #	% CR
3,4,3',4'-TeCB	77	17.8
3,4,4',5'-TeCB	81	< 3.0
3,3',4,4',5'-PeCB	126	< 3.0
3,3',4,4',5,5'-HexCB	169	< 0.1
2,3,3',4,4'-PeCB	105	2.5
2,3,4,4',5'-PeCB	114	3.4
2,3',4,4',5'-PeCB	118	100
2',3,4,4',5'-PeCB	123	< 0.1
2,3,3',4,4',5'-HexCB	156	7.2
2,3,3',4,4',5'-HexCB	157	< 0.1
2,3',4,4',5,5'-HexCB	167	< 0.1
2,3,3',4,4',5,5'-HepCB	189	< 0.1

PAHs	% CR
Acenaphthene	< 0.1
Acenaphthene	< 0.1
Anthracene	< 0.1
Benzo(a)anthracene	< 0.1
Benzo(a)pyrene	< 0.1
Benzo(b)fluoranthene	< 0.1
Benzo(ghi)perylene	< 0.1
Benzo(k)fluoranthene	< 0.1
Chrysene	< 0.1
Dibenzo(ah)anthracene	< 0.1
Fluoranthene	< 0.1
Hexachlorobenzene	< 0.1
Indeno(123cd)pyrene	< 0.1
Naphthalene	< 0.1
Phenanthrene	< 0.1
Pyrene	< 0.1
Hexachlorobenzene	< 0.1

(2) 標準品

本キットでは、安全性を考慮して、PCB と同様の反応性を示す擬似標準品 (3,3',4'-trichloro-4-methoxy-biphenyl) を用いています。擬似標準品と PCB #118 に対する反応性の比較結果を示します。

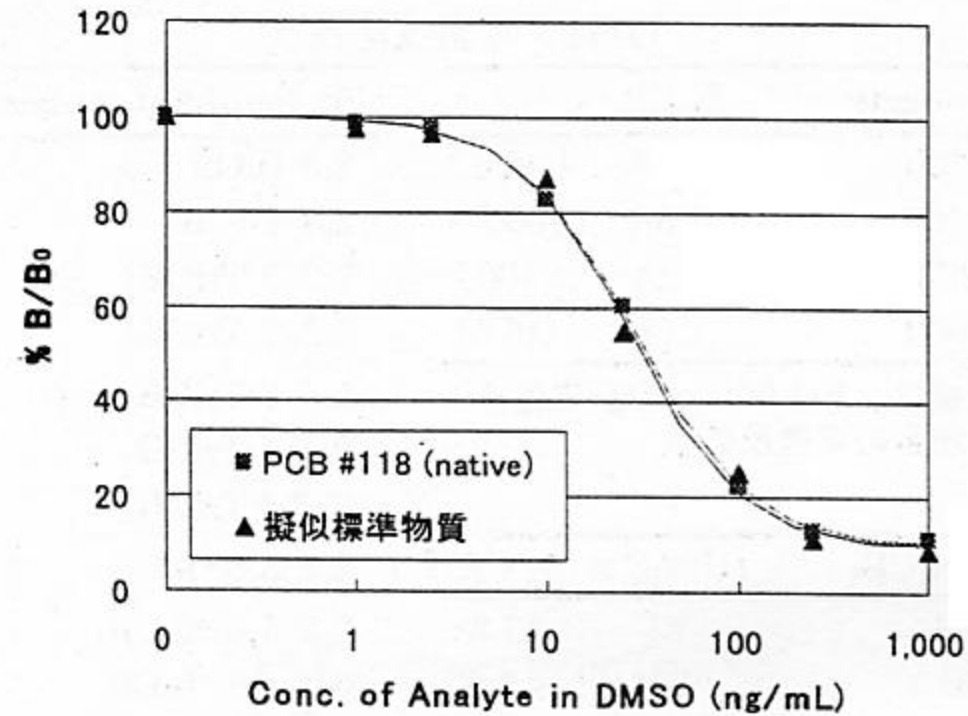


図 5 PCB #118 (native)と擬似標準品との反応性比較

(3) 測定感度

6.5 ng/ml

Zero standard (DMSO のみ) (n=8) の吸光度から平均値と SD 値を求め、平均値 - 3×SD の吸光度を最低感度とし、標準曲線よりその濃度を算出しました。

(4) 再現性

① 同時再現性

3種類の PCB 含有サンプルをそれぞれ合計 8 回測定したときのキットの同時再現性を示しています。

Table 3 同時再現性

サンプル	平均値 (ng/mL) ± SD	CV (%)	n
高濃度	98.4 ± 5.04	5.1	8
中濃度	55.5 ± 3.90	7.0	8
低濃度	18.5 ± 1.66	8.9	8

② 日差再現性

3ロットのキットを使用して、3種類の PCB 含有サンプルを 2 重で合計 6 回測定したときのキットの日差再現性を示しています。

Table 4 日差再現性

サンプル	平均値 (ng/mL) ± SD	CV (%)	n
高濃度	83.7 ± 9.66	11.5	6
中濃度	45.4 ± 7.92	17.5	6
低濃度	17.5 ± 2.88	16.4	6

(5) Precision profile

濃度を調整した標準液に対して、2重測定で6回測定を行い、各濃度における吸光度とそのSD値から%CVを求めプロットしたものです。

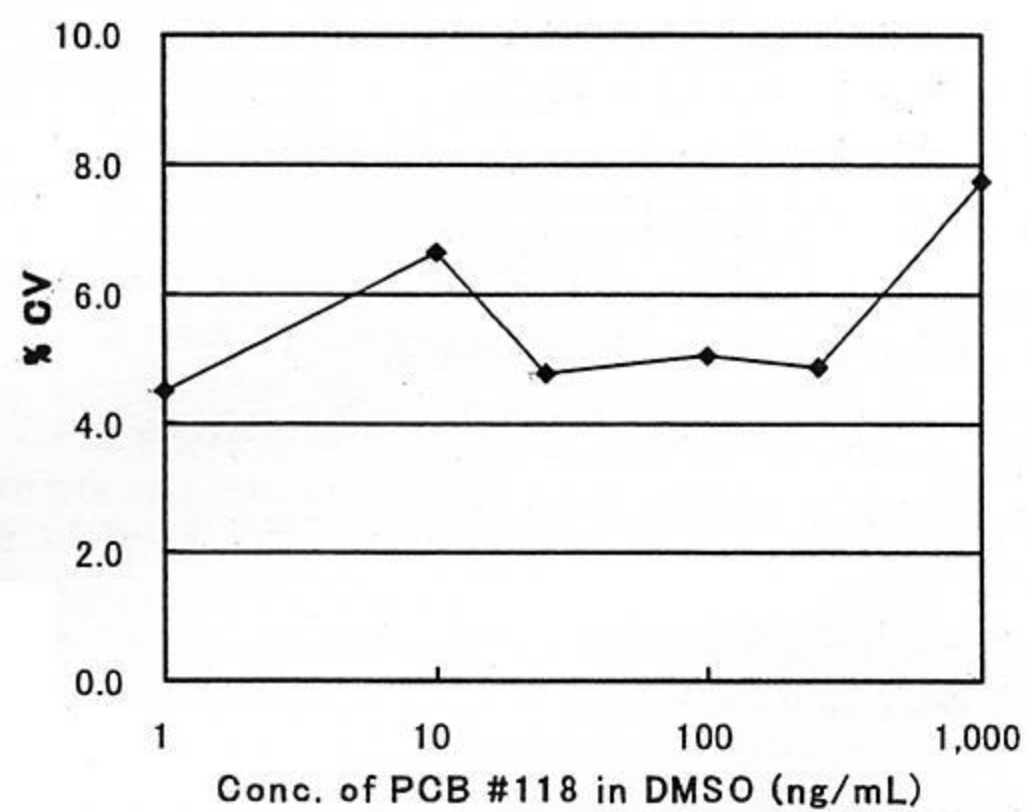


図6 Precision profile

(5) Precision profile

濃度を調整した標準液に対して、2重測定で6回測定を行い、各濃度における吸光度とそのSD値から%CVを求めプロットしたものです。

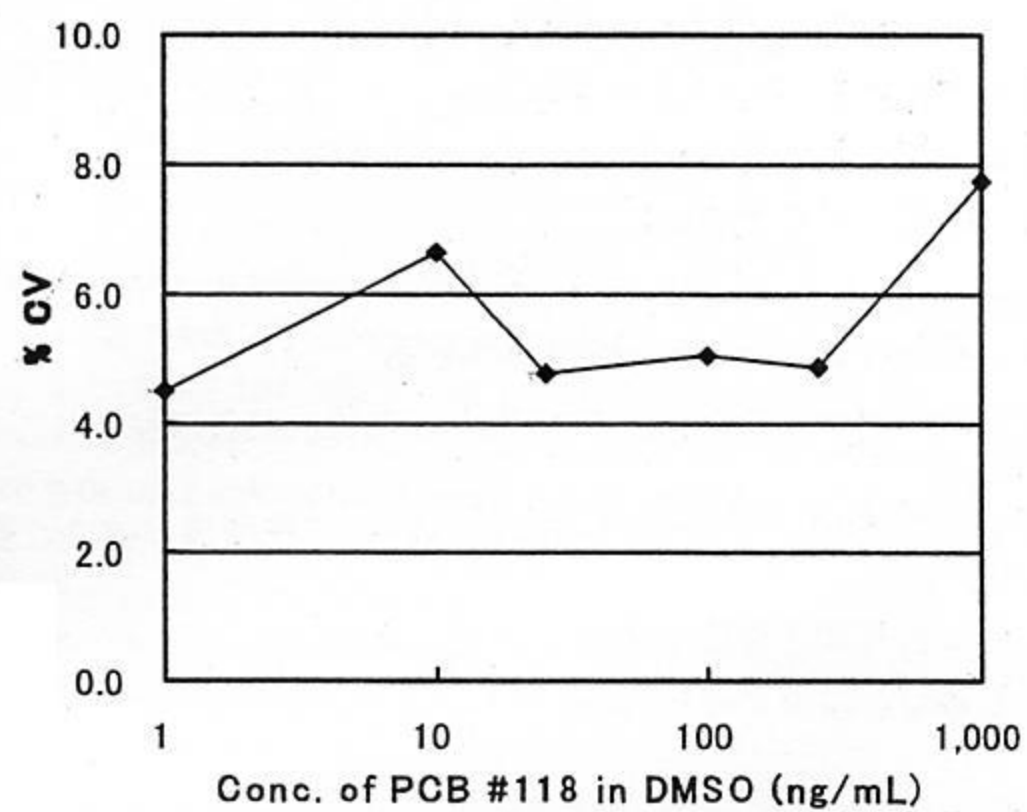


図 6 Precision profile

Claim 1 **Determination of Sensitivity****AIM**

To determine the sensitivity of the assay.

METHOD

The sensitivity, defined as three standard deviations below the mean optical density of 8 zero standard replicates was determined. The corresponding concentration was calculated from a standard curve ranging between 1 to 1,000 ng/ml set up in 8 replicates. The grand mean zero and standard values were then used to calculate the sensitivity. The data was plotted as mean \pm SD as a 4-parameter plot and calculated values by an attached calculation software of a micro-plate reader.

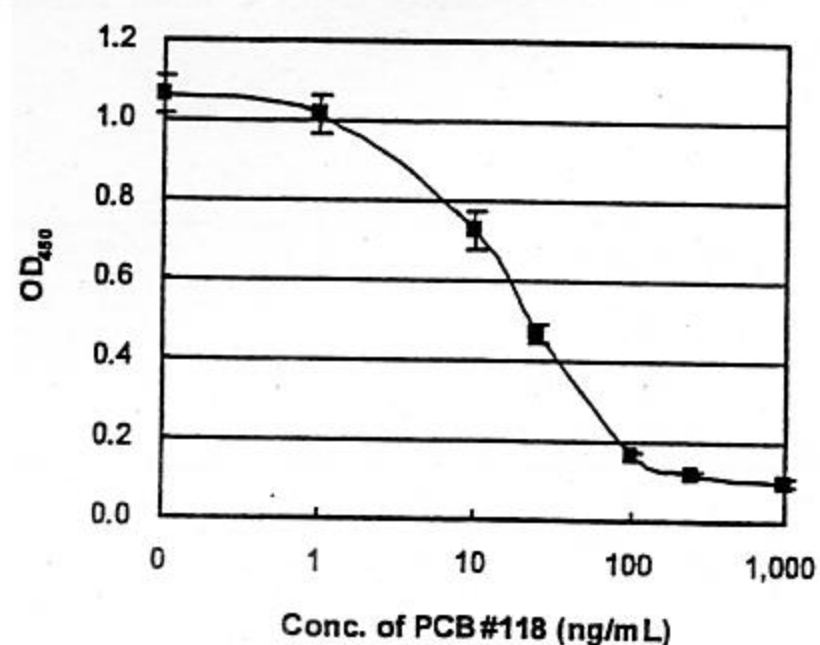
The sensitivity, defined as the concentration on the standard curve equivalent to 3 standard deviation below zero standard (n=10), was determined to be 6.5 ng/ml of PCB #118 in DMSO.

RESULTS

This was determined as 6.5 ng/ml. No cross ranging was found between the absorbance of zero-standard below 3SD.

Table 2. Intra-assay of the absorbancies (OD450) for PCB #118 (n=8)

ng/ML	Mean	SD	CV	Mean+3SD	Mean-3SD
0	1.061	0.048	4.5	1.20	0.92
1	1.010	0.048	4.8	1.16	0.87
10	0.725	0.048	6.6	0.87	0.58
25	0.467	0.022	4.8	0.53	0.40
100	0.163	0.008	5.1	0.19	0.14
250	0.117	0.006	4.9	0.13	0.10
1,000	0.100	0.008	7.7	0.12	0.08



Claim 2 **Demonstration of Within-Assay Precision**

AIM

To determine the within-assay precision of measurement of controls in the assay.

METHOD

Low, medium and high controls were prepared from a stock standard. The results were obtained by using one batch of performance trial kit.

RESULTS

Sample	Mean (ng/mL) ± SD	CV (%)	n
High	98.4 ± 5.04	5.1	8
Med	55.5 ± 3.90	7.0	8
Low	18.5 ± 1.66	8.9	8

CONCLUSIONS

The within assay precision was shown to be within acceptable limits.

Claim 3 **Demonstration of Between-Assay Precision**

AIM

To demonstrate the between-assay precision of measurement of controls in the assay.

METHOD

Low, medium and high controls were prepared from a stock standard. The results were obtained by using one batch of performance trial kit.

RESULTS

Sample	Mean (ng/mL) ± SD	CV (%)	n
High	83.7 ± 9.66	11.5	6
Med	45.4 ± 7.92	17.5	6
Low	17.5 ± 2.88	16.4	6

CONCLUSIONS

The between assay precision was shown to be within acceptable limits.

Claim 4

Determination of Stability

AIM

To demonstrate the stability of reagents when stored at the recommended temperature of 4°C.

METHOD

The standard curves were obtained using reagents from the 4°C stability trial at time points at 0, 3 and 6 months using one batch of kit. Low and high controls were prepared from a stock standard.

RESULTS

Typical assay data for a standard curve of 0 - 1,000ng/ml surrogate standard.

PCB STD (ng/ml)	OD450		
	T=0	T=3 months	T=6 months
0	1.599	1.597	1.157
2.5	1.575	1.485	1.251
10	1.510	1.415	1.125
25	1.359	1.178	0.992
100	0.885	0.755	0.460
250	0.498	0.413	0.276
1,000	0.164	0.189	0.098

Sample	Mean (ng/mL) ± SD	CV (%)	n
High	101 ± 10.7	10.6	3
Low	25.8 ± 3.24	12.5	3

CONCLUSIONS

The reagents give a good response after 6 months storage at 4°C. The 6 months period precision was shown to be within acceptable limits.

Claim 5

Demonstration of Between-plate Precision

AIM

To demonstrate the between-plate precision of measurement of controls in the assay.

METHOD

Low and high controls were prepared from a stock standard. The results were obtained by using six batch of performance trial kit.

RESULTS

Sample	Mean (ng/mL) \pm SD	CV (%)	n
High	49.4 \pm 3.6	9.1	6
Low	21.5 \pm 1.9	7.2	6

CONCLUSIONS

The between plate precision was shown to be within acceptable limits.

Claim 6

Cross-reactivity of the Assay

AIM

To investigate the degree of cross-reactivity of the predominant PCB congener in PCB products (e.g., Aroclor and Kanechlor).

METHOD

Standard solution of each congener were prepared in DMSO.

RESULTS

The cross-reactivities (% CR) are described as ratios between the IC₅₀ value of each compound and that of PCB #118.

This was done for significant cross-reactants only.

PCB products	% CR	PAHs	% CR	
Kanechlor 300 (equivalent to Aroclor 1242)	3.87 (42.3)*	Acenaphthene	< 0.1	
Kanechlor 400 (Aroclor 1248)	7.36 (80.5)	Acenaphthene	< 0.1	
Kanechlor 500 (Aroclor 1254)	9.14 (100)	Anthracene	< 0.1	
Kanechlor 600 (Aroclor 1260)	1.69 (18.5)	Benzo(a)anthracene	< 0.1	
		Benzo(a)pyrene	< 0.1	
		Benzo(b)fluoranthene	< 0.1	
		Benzo(ghi)perylene	< 0.1	
		Benzo(k)fluoranthene	< 0.1	
		Chrysene	< 0.1	
		Dibenzo(ah)anthracene	< 0.1	
		Fluoranthene	< 0.1	
		Hexachlorobenzene	< 0.1	
		Indeno(123cd)pyrene	< 0.1	
		Naphthalene	< 0.1	
		Phenanthrene	< 0.1	
		Pyrene	< 0.1	
		Hexachlorobenzene	< 0.1	
			< 0.1	
Predominant PCBs	IUPAC #	% CR	Other related compounds	% CR
2,3-DiCB	5	< 0.1	Biphenyl	< 0.1
2,4'-DiCB	8	< 0.1	1,2-dichlorobenzene	< 0.1
2,2',5'-TriCB	18	< 0.1	3,4-dichloroaniline	< 0.1
2,3,3'-TriCB	20	< 0.1	3,4-dichloroanisole	< 0.1
2,4,4'-TriCB	28	3.5	3,4-dichloronitro-benzene	< 0.1
2,4',5'-TriCB	31	12.9	3,4-dichlorophenol	< 0.1
2',3,4'-TriCB	33	2.6	3,4-dichlorotoluene	< 0.1
2,2',3,5'-TeCB	44	< 0.1	1,2,3-trichlorobenzene	< 0.1
2,2',5,5'-TeCB	52	< 0.1	3,4,5-trichloroaniline	< 0.1
2,3',4,4'-TeCB	66	15.2	3,4,5-trichlorophenol	< 0.1
2,3',4',5'-TeCB	70	14.9	2,3,7,8-TCDD	< 0.1
2,2',3,5',6'-PeCB	95	< 0.1	2,3,7,8-TCDF	< 0.1
2,2',4,5,5'-PeCB	101	< 0.1		
2,3,3',4,4'-PeCB	105	2.5		
2,3,3',4',6'-PeCB	110	0.88		
2,3',4,4',5'-PeCB	118	100		
2,2',3,4,4',5'-HexCB	138	< 0.1		
2,2',3,4',5',6'-HexCB	149	< 0.1		
2,2',4,4',5,5'-HexCB	153	< 0.1		
2,2',3,3',4,4',5'-HepCB	170	< 0.1		
2,2',3,3',4,5,6'-HepCB	174	< 0.1		
2,2',3,4,4',5,5'-HepCB	180	< 0.1		

2,2',3,4',5,5',6-HepCB	187	< 0.1
2,2',3,3',4,4',5,5'-OctCB	194	< 0.1
2,2',3,3',4,4',5',6-OctCB	196	< 0.1
2,2',3,3',4,5,5',6'-OctCB	199	< 0.1
2,2',3,4,4',5,5',6-OctCB	203	< 0.1

CONCLUSIONS

The assay is highly selective to PCB #118 among predominant PCB congener in PCB products. There is no significant cross-reactivity with other related compounds such as PAHs and polychlorobenzen derivatives.

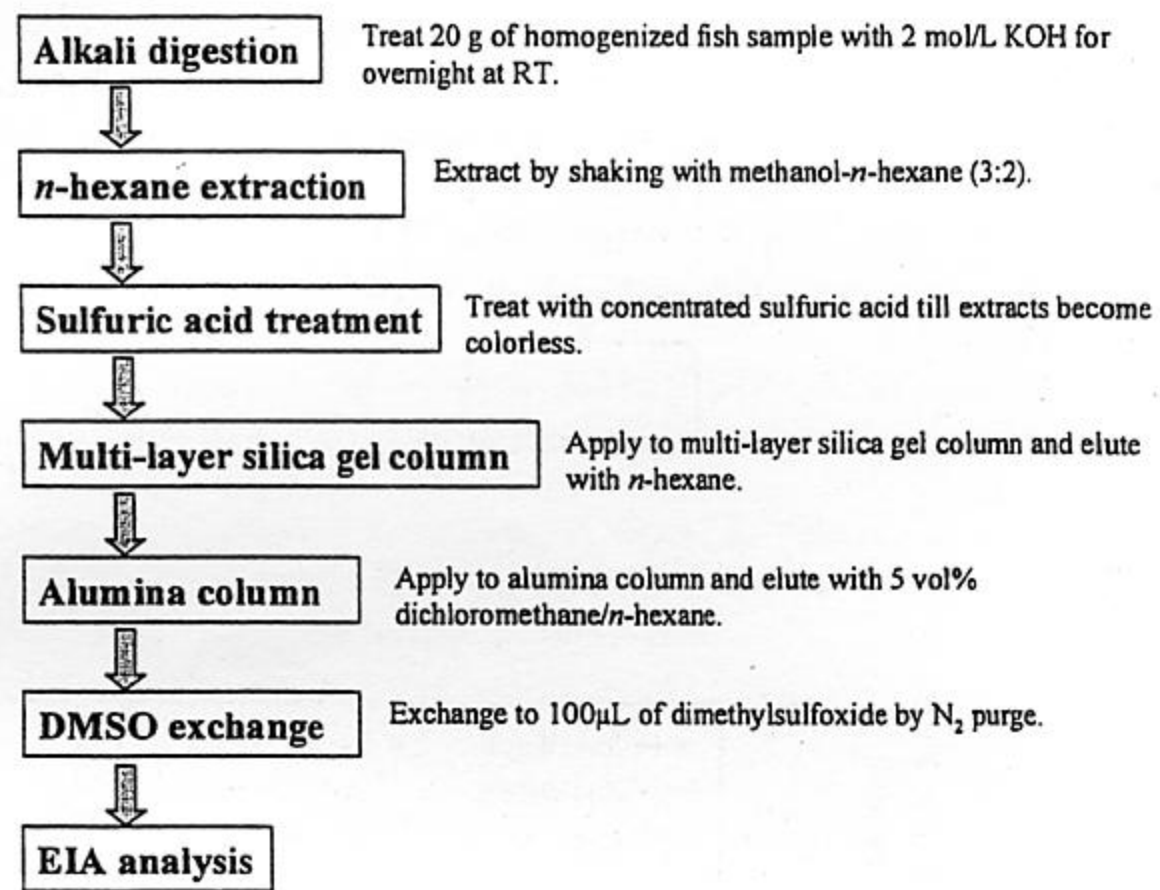
Claim 7 Demonstration of the correlation between GC-ECD and EIA in fish samples

AIM

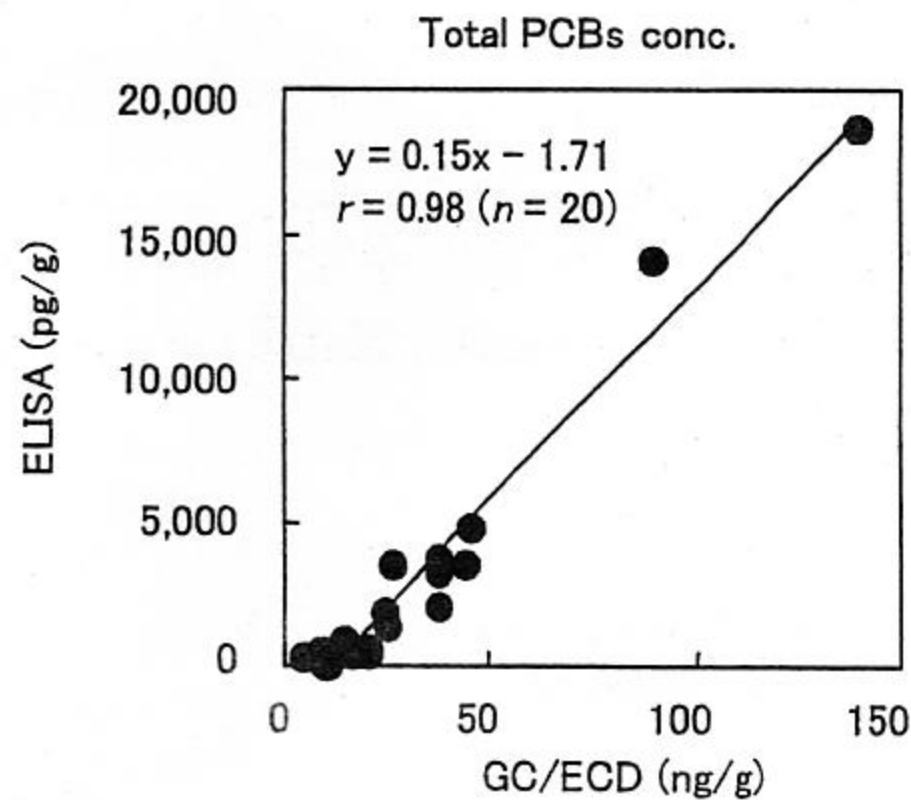
To demonstrate the applicability to fish samples.

METHOD

Fish samples are pretreated as shown in the following figure.



RESULTS



CONCLUSION

A good correlation between GC-MS data and EIA measurements in fish samples was demonstrated.

Claim 8 samples

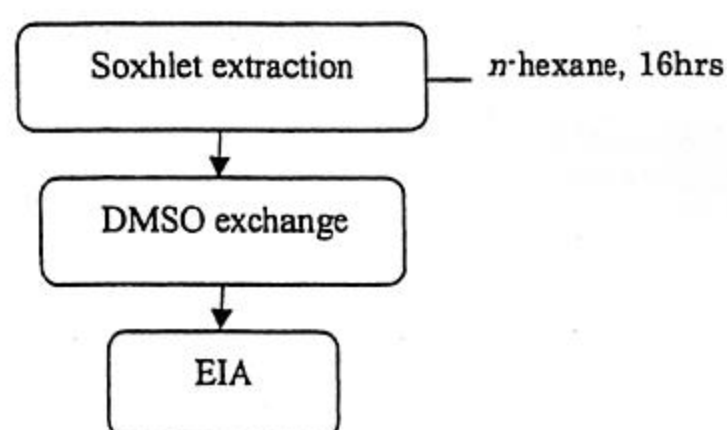
Demonstration of the correlation between GC-ECD and EIA in soil

AIM

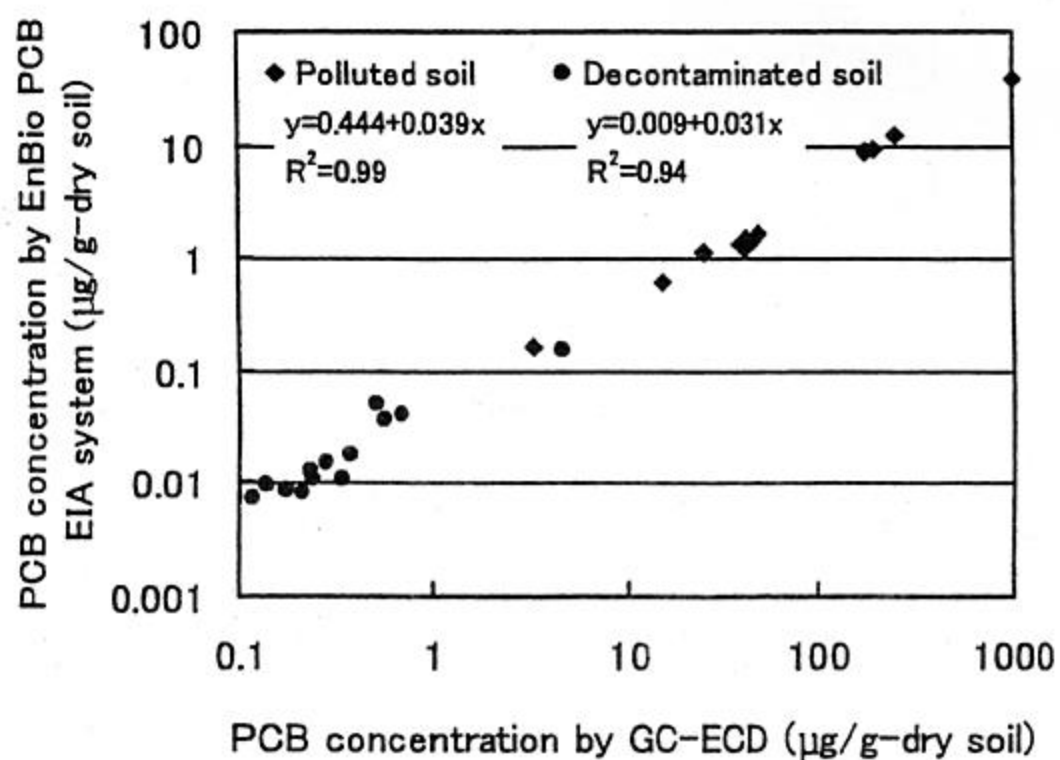
To demonstrate the applicability to PCB contaminated soil samples.

METHOD

PCB polluted and decontaminated soil samples are pretreated as shown in the following figure.



RESULTS



CONCLUSION

A good correlation between GC-ECD data and EIA measurements in polluted and decontaminated soil samples was demonstrated.

技術の先進性について

当該技術は、過去に使用されていた PCB 製品に含まれている主要異性体のうち、PCB#118 に対する特異的な反応性を有するモノクローナル抗体を用いていることを特徴とする。過去に使用されていた PCB 製品中に含まれる 20 種以上の主要異性体に対する交差反応性も確認しており、一部の異性体には若干の交差反応性を示す。

これら当該キットの詳細なバリデーション結果を元に、実試料においても、機器分析にて測定した PCB 各異性体濃度と交差反応性を掛け合わせた総和とキット測定濃度の間に良好な一致が見られており、PCB 各異性体の存在量に対して相加的な反応を示すことが検証されている。

発表論文：

- 1) A. Okuyama, H. Takenaka, K. Nishi, H. Mizukami, S. Kozaki, M. Kirihata, K. Miyatake, DEVELOPMENT OF MONOCLONAL ANTIBODIES AND IMMUNOASSAY SYSTEM FOR PRE-SCREENING COPLANAR POLYCHLORINATED BIPHENYLS, *Organohalogen compounds*, 54 (2001), 44-47 ~抗体開発
- 2) A. Okuyama, H. Takenaka, K. Nishi, H. Mizukami, S. Kozaki, M. Kirihata, K. Miyatake, H. Takigami, S. Sakai, M. Morita, DEVELOPMENT OF ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR THE PRE-SCREENING OF COPLANAR POLYCHLORINATED BIPHENYLS, *Organohalogen compounds*, 58 (2002), 333-336 ~ELISA 開発
- 3) H. Takigami, T. Etoh, T. Nishio, S. Sakai, APPLICATION OF SOLVENT EXTRACTION TECHNOLOGY TO PCB CONTAMINATED SOIL AND CHEMICAL/BIOASSAY MONITORING, *Organohalogen compounds*, 66 (2004), 1221 ~土壌試料への適用
- 4) T. Tsutsumi, Y. Amakura, A. Okuyama, H. Mizukami, Y. Tanioka, K. Ueda, K. Sakata, K. Sasaki, T. Maitani, Applicability of ELISA to screen for dioxin-like PCBs in retail fish, *Organohalogen compounds*, 66 (2004), 603 ~食品(魚)試料への適用

その他

環境モニタリングへの適用性：

土壌及び生物(魚)試料における性能実証を行っている。土壌汚染試料に関しては、特に、PCB 組成のある程度判明している汚染サイトにおいて、浄化モニタリングへの適用への有効可能性が実証されている (Takigami *et al.*, 2004)。技術的には、底質への展開も可能であり、土壌・底質中の PCB モニタリングへの適用可能性が高いものと考えられる。

一方、PCB の人体への摂取経路の大部分を占めると考えられる食品(魚)試料においても、当該技術による測定が可能であることが実証されており (Tsutsumi *et al.*, 2004)、生物試料中の PCB モニタリングへの適用可能性も高い。

将来の発展性、今後の取組：

バイオアッセイの環境モニタリングへの適用を考慮する際の技術的な課題として、前処理の簡便化およびアッセイ時のキット操作性(熟練度)が挙げられる。当社では、これらの技術的課題を解決するため、ELISA よりも操作的に簡便である免疫クロマトグラフィーを用いたアッセイ法の開発を行っており、既に当該申請キットと同一の抗体を用いた免疫クロマトグラフィーの商品化に成功している。免疫クロマトグラフィーを用いたキットの場合、土壌からの前処理に関しては、抽出操作のみで測定可能であることが確認されており、現場でのスクリーニング技術としての展開を計画している。