

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	日本エンバイロケミカルズ株式会社
技術・製品の名称	技術:ELISA法(酵素免疫測定法) 製品の名称:環境汚染診断薬エコロジーナ 陰イオン界面活性剤LAS ELISAキット(マイクロプレート)

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

本報告書は、実証試験計画書に基づき実施した試験結果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センター

所長 吉村 幸男

製品名称	環境汚染診断薬エコロジーナ 陰イオン界面活性剤 LAS ELISA キット
環境技術開発者	日本エンバイロケミカルズ(株)
実証機関	兵庫県
対象物質	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩 (LAS)
実証試験の実施期間	平成 16 年 12 月 20 日 ~ 平成 17 年 1 月 24 日

### 1．実証対象技術の概要

この実証対象製品は、陰イオン界面活性剤直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩 (LAS) 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：水質、底質) の LAS 測定 ELISA キットである。

ELISA の原理は、競合反応 (LAS 濃度が高い試料では吸光度が低く、LAS 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	環境汚染診断薬エコロジーナ 陰イオン界面活性剤 LAS ELISA キット（マイクロプレート）
型番	300-36051 《和光純薬工業(株)商品コード》
販売・製造元	《販売》和光純薬工業(株) 《製造》日本エンバイロケミカルズ(株)
重量（キット一式，g）	580g
価格（円）	
分析対象物質	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩（LAS）
対象環境媒体	水質・底質・生物・その他（ ） 底質試料は抽出操作が必要。
利用用途	環境試料中の LAS 濃度の測定
標準試薬・種類	付属（調製済 / 調製要）直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> SO <sub>3</sub> Na)10mg/L（10%メタノール溶液）
操作環境（室温）	15 ~ 30 （恒温槽（例 20 ）の使用が望ましい）
製品保管条件	2 ~ 8
製品保証期間	製造後 24 ヶ月間
同時測定数（最多）	43 試料（n=2 で 1 キット使用時）
測定時間	2.5 時間（固相抽出等の前処理時間を除く）

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	陰イオン界面活性剤 LAS ELISA キット	
環境技術開発者	日本エンバイロケミカルズ(株)	
対象物質	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩 (LAS)	
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 16 年 12 月 14 日 ~ 平成 17 年 1 月 22 日	
(1) 基本的な性能	実験データ	【参考：製品データ】
測定範囲	調製濃度 20 ~ 1000 $\mu$ g/L (3 濃度系列) での 相対値：60 ~ 123%, CV：10.8 ~ 58.5% 調製濃度 20 ~ 1000 $\mu$ g/L (5 濃度系列) での 相対値：93 ~ 129%, CV：2.6 ~ 12.1% 両結果を考慮した測定範囲：50 ~ 1000 $\mu$ g/L	20 ~ 1000 $\mu$ g/L
検出下限および定量下限	調製濃度 20 $\mu$ g/L の SD から求めた場合の 検出下限 (3SD)：9.0 $\mu$ g/L, 定量下限 (10SD)：30 $\mu$ g/L	測定下限：20 $\mu$ g/L
繰返し再現性	調製濃度 100 $\mu$ g/L での CV：13.5% (SD：15.5 $\mu$ g/L)	測定濃度 20 ~ 500 $\mu$ g/L での CV：6.0 ~ 11.8% 測定濃度 36.5 ~ 225.1 $\mu$ g/L での CV：6.0 ~ 11.8% (河川水)
日間再現性	調製濃度 20 ~ 1000 $\mu$ g/L で、同一週の 3 日 間に測定した場合の CV：7.1 ~ 43.0% (43.0%は 20 $\mu$ g/L の場合)	測定濃度 9.5 ~ 89.5 $\mu$ g/L での CV：7.2 ~ 17.0% (河川水)
期間再現性	調製濃度 20 ~ 1000 $\mu$ g/L で、1 ヶ月を隔て て 2 回測定した場合の CV： 最初：3.2 ~ 17.4% 1 ヶ月後：2.6 ~ 10.6%	保存安定性 24 ヶ月
プレート間再現性	調製濃度 20 ~ 1000 $\mu$ g/L で、同ロットプレ ート 2 枚、異ロットプレート 1 枚間の CV：10.4 ~ 51.6% (51.6%は 20 $\mu$ g/L の場合)	-
交差反応性	交差反応率： ドデシル硫酸ナトリウム：0.9% ベンゼンスルホン酸ナトリウム：<0.1%	交差反応率： ドデシル硫酸ナトリウム：1.0% ベンゼンスルホン酸：<0.1%
(2) 実用的な性能		
回収特性	対象物質を 100 $\mu$ g/L 添加した河川水に、フ ミン酸ナトリウムを添加 (0 ~ 50mg/L) し た場合の回収影響率：100 ~ 586%	河川水への添加回収率： 対象物質 50 $\mu$ g/L：82 ~ 100% 100 $\mu$ g/L：80 ~ 94%
測定精度等	メーカー推奨の前処理 (固相抽出) により 3 河川水全てで検出：1.0 ~ 11.7 $\mu$ g/L 機器分析による検出範囲：0.90 ~ 2.1 $\mu$ g/L ELISA/機器比：1.1 ~ 5.6	HPLC 分析法との相関： r=0.98 (y=0.84X+2.63) 単位： $\mu$ g/L, n=20 以上
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 項目の結果から、50 ~ 1000  $\mu\text{g/L}$  の濃度範囲においては概ね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

メーカー推奨の前処理（濃縮操作）を用いることにより、妥当な感度や精度が得られた。環境水中のマトリックスの影響に関する検討を行えば、実用化は可能である。

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、試料の前処理から測定結果が得られるまで 4 ~ 5 時間であり、同時に約 25 試料（3 重測定）の測定が可能となる。したがって、操作の簡便性は高いと言える。

## 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	4
2.1 実証申請者	4
2.2 実証対象技術の原理	4
2.3 実証対象製品のデータ（性能，製品製造者，製品番号等）	4
3. 実証試験実施体制	5
3.1 実証試験申請者	5
3.2 実証試験実施者	5
3.3 実証試験実施場所	5
(1) ELISA 法	5
(2) 機器分析法	5
3.4 実証試験実施期間	5
4. 試験方法	6
4.1 共通して行う試験操作	6
(1) 製品の操作	6
(2) 検量線作成用標準溶液の調製	6
(3) 吸光度の測定	6
(4) 検量線の作成	6
(5) 実測濃度の算出	6
4.2 基本的な性能	7
(1) 測定範囲	7
(2) 検出下限および定量下限	8
(3) 繰返し再現性	9
(4) 日間再現性	10
(5) 期間再現性	11
(6) プレート間再現性	12
(7) 交差反応性	13
4.3 実用的な性能	14
(1) 回収特性	14
(2) 測定精度等	15

5. 試験結果 .....	16
5.1 基本的な性能 .....	16
(1) 測定範囲 .....	16
(2) 検出下限および定量下限 .....	20
(3) 繰返し再現性 .....	22
(4) 日間再現性 .....	24
(5) 期間再現性 .....	28
(6) プレート間再現性 .....	31
(7) 交差反応性 .....	35
5.2 実用的な性能 .....	38
(1) 回収特性 .....	38
(2) 測定精度等 .....	40
6. 実証試験結果の検討と考察 .....	42
(1) 製品性能の信頼性 .....	43
(2) 一般環境モニタリングでの実用性 .....	43
(3) 製品操作等の簡便性 .....	43

## 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	ELISA法（酵素免疫測定法）・環境汚染診断薬エコロジーナ 陰イオン界面活性剤 LAS ELISA キット（マイクロプレート）
実証申請者	日本エンバイロケミカルズ株式会社
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 16 年 12 月 20 日 ~ 平成 17 年 1 月 24 日
製品名	環境汚染診断薬エコロジーナ 陰イオン界面活性剤 LAS ELISA キット（マイクロプレート）
型番	300-36051 《和光純薬工業(株)商品コード》
販売・製造元	《販売》和光純薬工業(株) 《製造》日本エンバイロケミカルズ(株)
重量（g）	580g
価格（円）	
分析対象物質	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩（LAS）
対象環境媒体	<input checked="" type="checkbox"/> 水質 <input type="checkbox"/> 底質・生物・その他（ ） 底質試料は抽出操作が必要
利用用途	環境試料中の LAS 濃度の測定
標準試薬・種類	付属（調製済 / 調製要）直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> SO <sub>3</sub> Na)10mg/L（10%メタノール溶液）
操作環境（室温）	15 ~ 30 （恒温槽（例 20 ）の使用が望ましい）
製品保管条件	2 ~ 8
製品保証期間	製造後 24 ヶ月間
同時測定数（最多）	43 試料（n=2 で 1 キット使用時）
全体測定時間	2.5 時間（固相抽出等の前処理時間を除く）

## 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、一致する場合としない場合とが認められた。実用的な性能に関しては、フミン質をはじめとするマトリックスによる正の妨害が懸念された。

### (1) 基本的な性能

#### 測定範囲

申請データ：20～1000 µg/L      実証データ：50～1000 µg/L

#### 検出下限及び定量下限

申請データ：測定下限 20 µg/L (検出下限，定量下限のデータなし)

実証データ：検出下限 9.0 µg/L，定量下限 30 µg/L

#### 繰返し再現性

申請データ：測定濃度 20～500µg/L における変動係数 6.0～11.8%

測定濃度 36.5～225.1µg/L における変動係数 1.4～7.3%

(河川水試料の場合)

実証データ：測定濃度 100 µg/L における変動係数 13.5%

#### 日間再現性

申請データ：測定濃度 9.5～89.5µg/L における変動係数 7.2～17.0%

(河川水試料の場合)

実証データ：測定濃度 20µg/L における変動係数 43.0%，100µg/L における変動

係数 7.1%，1000µg/L における変動係数 15.7%

#### 期間再現性

申請データ：保存安定性 24 ヶ月

実証データ：測定濃度 20µg/L における変動係数 6.8～10.5%，100µg/L における

変動係数 2.6～3.2%，1000µg/L における変動係数 10.6～17.4%

プレート間再現性

申請データ：記述なし

実証データ：測定濃度 20 $\mu\text{g/L}$  における変動係数 51.6% , 100 $\mu\text{g/L}$  における変動係数 10.4% , 1000 $\mu\text{g/L}$  における変動係数 14.9%

交差反応性

申請データ：ドデシル硫酸ナトリウム 1.0% ,  
ベンゼンスルホン酸 <0.1%

実証データ：ドデシル硫酸ナトリウム 0.9% ,  
ベンゼンスルホン酸ナトリウム <0.1%

## (2) 実用的な性能

回収特性

申請データ：回収率 82 ~ 100% ( 50  $\mu\text{g/L}$  : 河川水への添加)

回収率 80 ~ 94% ( 100  $\mu\text{g/L}$  : 河川水への添加)

実証データ：回収影響率 100 ~ 586% ( 100  $\mu\text{g/L}$  : 河川水への添加)

妨害物質：フミン酸ナトリウム 0 ~ 50mg/L

測定精度等

申請データ：HPLC 法との相関

$r=0.98$  (  $y=0.84x+2.63$  : 単位  $\mu\text{g/L}$  ,  $n=20$  以上 )

実証データ：

実試料 ( 河川水 ) 3 試料について、機器分析法 ( LC/MS/MS ) と同様の前処理により、10 ~ 100 倍の濃縮を行って測定した。いずれの試料でも測定のばらつきは大きくなかった。しかし、測定値については、低濃度の 1 地点 ( 1.0  $\mu\text{g/L}$  : LC/MS/MS 分析 0.90  $\mu\text{g/L}$  ) では機器分析法の結果と良く一致したが、相対的に高濃度の 2 地点 ( 4.3  $\mu\text{g/L}$  および 11.7  $\mu\text{g/L}$  : LC/MS/MS 分析 1.9  $\mu\text{g/L}$  および 2.1  $\mu\text{g/L}$  ) では 2 ~ 6 倍程度高い値が得られた。

## 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：日本エンバイロケミカルズ株式会社

担当者所属・氏名：事業開発室 室長 道正 伸

住 所：〒105-0023 東京都港区芝浦 1-2-1 シーバンス N 館 9F

電話番号：03-5444-9891

F A X 番号：03-5444-9860

e-mail アドレス：eco@jechem.co.jp

### 2.2 実証対象技術の原理

本実証対象製品は、陰イオン界面活性剤直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩（LAS）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：水質，底質）の LAS 測定 ELISA 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 : 古武家 善成

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 : Yoshinari\_kobuke@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 16 年 12 月 20 日 ~ 平成 17 年 1 月 24 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：バイオメトリクス社製 デルタソフト）。

#### (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	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩（LAS）
対象製品名	環境汚染診断薬エコロジーナ 陰イオン界面活性剤 LAS ELISA キット（マイクロプレート）
製品番号	ロット番号 T2AQ1
製造年月日	-（有効期限：2006.1）
測定範囲（製品仕様）	20 ~ 1000 µg/L
試験日時	平成 16 年 12 月 20 日 15：00～21：00
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	21～25
使用した市販標準品	直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム ABS 測定用 和光純薬工業(株)社製 製品番号 190-07431 ロット番号 RWE9217
検量線用ソフト名	バイオメトリクス社製 デルタソフト
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 古武家善成

#### 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	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩（LAS）
対象製品名	環境汚染診断薬エコロジーナ 陰イオン界面活性剤 LAS ELISA キット（マイクロプレート）
製品番号	ロット番号 T2AQ1
製造年月日	-（有効期限：2006.1）
測定範囲（製品仕様）	20 ~ 1000 µg/L
試験日時	平成 16 年 12 月 20 日 15：00 ~ 21：00
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 ~ 25
使用した市販標準品	直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム ABS 測定用 和光純薬工業(株)社製 製品番号 190-07431 ロット番号 RWE9217
検量線用ソフト名	バイオメトリクス社製 デルタソフト
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 古武家善成

### 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	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩（LAS）
対象製品名	環境汚染診断薬エコロジーナ 陰イオン界面活性剤 LAS ELISA キット（マイクロプレート）
製品番号	ロット番号 T2AQ1
製造年月日	-（有効期限：2006.1）
測定範囲（製品仕様）	20 ~ 1000 µg/L
試験日時	平成 16 年 12 月 20 日 15：00～21：00
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	21～25
使用した市販標準品	直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム ABS 測定用 和光純薬工業(株)社製 製品番号 190-07431 ロット番号 RWE9217
検量線用ソフト名	バイオメトリクス社製 デルタソフト
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 古武家善成

#### 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	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩（LAS）
対象製品名	環境汚染診断薬エコロジーナ 陰イオン界面活性剤 LAS ELISA キット（マイクロプレート）
製品番号	ロット番号 T2AQ1
製造年月日	-（有効期限：2006.1）
測定範囲（製品仕様）	20 ~ 1000 µg/L
試験日時	平成 16 年 12 月 20 日 15：00～21：00 平成 16 年 12 月 22 日 9：30～14：35 平成 16 年 12 月 24 日 9：30～18：30
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	21～25（12/20），25～27（12/22），24（12/24）
使用した市販標準品	直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム ABS 測定用 和光純薬工業(株)社製 製品番号 190-07431 ロット番号 RWE9217
検量線用ソフト名	バイオメトリクス社製 デルタソフト
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 古武家善成

##### 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	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩（LAS）
対象製品名	環境汚染診断薬エコロジーナ 陰イオン界面活性剤 LAS ELISA キット（マイクロプレート）
製品番号	ロット番号 T2AQ1
製造年月日	-（有効期限：2006.1）
測定範囲（製品仕様）	20 ~ 1000 µg/L
試験日時	平成 16 年 12 月 22 日 9：30～14：35 平成 17 年 1 月 24 日 11：25～17：47
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	25～27（12/22），22～23（1/24）
使用した市販標準品	直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム ABS 測定用 和光純薬工業(株)社製 製品番号 190-07431 ロット番号 RWE9217
検量線用ソフト名	バイオメトリクス社製 デルタソフト
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 古武家善成

### 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	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩（LAS）
対象製品名	環境汚染診断薬エコロジーナ 陰イオン界面活性剤 LAS ELISA キット（マイクロプレート）
製品番号	ロット番号 T2AQ1, T2CP2-S
製造年月日	-（有効期限：2006.1）（T2AQ1） -（有効期限：2006.3）（T2CP2-S）
測定範囲（製品仕様）	20 ~ 1000 µg/L
試験日時	平成 16 年 12 月 22 日 9：30 ~ 14：35
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	25 ~ 27
使用した市販標準品	直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム ABS 測定用 和光純薬工業(株)社製 製品番号 190-07431 ロット番号 RWE9217
検量線用ソフト名	バイオメトリクス社製 デルタソフト
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 古武家善成

### 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	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩（LAS）
対象製品名	環境汚染診断薬エコロジーナ 陰イオン界面活性剤 LAS ELISA キット（マイクロプレート）
製品番号	ロット番号 T2AQ1
製造年月日	-（有効期限：2006.1）
測定範囲（製品仕様）	20 ~ 1000 µg/L
試験日時	平成 16 年 12 月 24 日 9：30～18：30
試験場所	兵庫県立健康環境科学研究所 安全科学部
試験時室内温度	24
検量線用ソフト名	バイオメトリクス社製 デルタソフト
試験機関・担当者	兵庫県立健康環境科学研究所 安全科学部 古武家善成

表 4.2.8 使用した市販標準品

物質名（標準品）		試薬会社名	規格	含量	製品番号	ロット番号
対象物質	直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム（LAS）	和光純薬工業（株）社製	ABS 測定用	1g	190-07431	RWE9217
類似物質	ドデシル硫酸ナトリウム（DS）	和光純薬工業（株）社製	生化学用	25g	197-07142	KLK4484
	ベンゼンスルホン酸ナトリウム（BS）	和光純薬工業（株）社製	和光一級	25g	197-01282	CEP1970

### 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	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩（LAS）
対象製品名	環境汚染診断薬エコロジーナ 陰イオン界面活性剤 LAS ELISA キット（マイクロプレート）
製品番号	ロット番号 T2AQ1
製造年月日	-（有効期限：2006.1）
測定範囲（製品仕様）	20 ~ 1000 µg/L
試験日時	平成 16 年 12 月 27 日 11：30～19：10
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	21
使用した市販標準品	直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム ABS 測定用 和光純薬工業(株)社製 製品番号 190-07431 ロット番号 RWE9217
使用した模擬環境試料	フミン酸ナトリウム アクロス社製 製品番号 120860050 ロット番号 A019444301
検量線用ソフト名	バイオメタリクス社製 デルタソフト
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 古武家善成

#### 試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

## (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	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩（LAS）
対象製品名	環境汚染診断薬エコロジーナ 陰イオン界面活性剤 LAS ELISA キット（マイクロプレート）
製品番号	ロット番号 T2AQ1
製造年月日	-（有効期限：2006.1）
測定範囲（製品仕様）	20 ~ 1000 µg/L
試験日時	平成 17 年 1 月 7 日 10：00 ~ 23：35
試験場所	兵庫県立健康環境科学研究所 安全科学部
試験時室内温度	21 ~ 25
検量線用ソフト名	バイオメトリクス社製 デルタソフト
試験機関・担当者	兵庫県立健康環境科学研究所 安全科学部 古武家善成

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	庄下川 庄下川橋	平成 16 年 11 月 25 日	1L	pH8.4 , BOD1.5mg/L
S2	猪名川 利倉橋	平成 16 年 11 月 25 日	1L	pH7.4 , BOD6.1mg/L
S3	夢前川 京見橋	平成 16 年 11 月 26 日	1L	pH8.2 ,BOD<0.5mg/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。

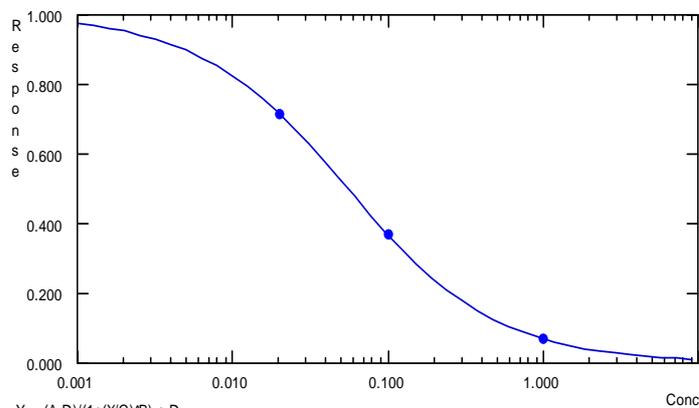
表 5.1.1 「測定範囲試験」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液			
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3
所定濃度	μg/L	0	20	100	1000
実測回数	回	3	3	3	3
ELISA 実測 B/B0* (吸光度)	1	0.949 (1.516)	0.736 (1.175)	0.388 (0.619)	0.064 (0.102)
	2	0.994 (1.588)	0.718 (1.147)	0.357 (0.570)	0.063 (0.101)
	3	1.057 (1.689)	0.693 (1.107)	0.366 (0.584)	0.080 (0.128)

\* 添付標準 0 μg/L の平均吸光度を B0 とした。

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	R <sup>2</sup>
値	1.000	0.904	0.055	0.001	1.000



$Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D$   
 $A = 1.000, B = 0.904, C = 0.055, D = 0.001, 50\% = 0.501$   
 $RMS = 8E-04, r = 1.000, r^2 = 1.000, J = 1.000$

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 「測定範囲試験」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	
調製濃度	μg/L	20	100	1000	
実測回数	回	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0* (吸光度)	1	-	0.760 (1.214)	0.334 (0.533)	0.057 (0.090)
	2	-	0.916 (1.464)	0.319 (0.510)	0.052 (0.082)
	3	-	0.748 (1.195)	0.363 (0.580)	0.068 (0.108)
	平均	-	0.808 (1.291)	0.339 (0.541)	0.059 (0.094)
換算値	1	μg/L	15.4	119	1262
	2	μg/L	3.9	127	1409
	3	μg/L	16.5	103	1015
	平均	μg/L	11.9	116	1229
標準偏差**	μg/L	7.0 (0.150)	12.6 (0.036)	199 (0.013)	
変動係数**	%	58.5 (11.6)	10.8 (6.6)	16.2 (14.2)	
相対値***	%	60	116	123	

\* 添付標準 0 μg/L の平均吸光度を B0 とした。

\*\* カッコ内は吸光度から求めた値。

\*\*\* 調整濃度を 100% とした時の各実測濃度 (3 重測定の平均値) との割合 (%)

「測定範囲」の追加試験

試験用試料溶液の濃度系列を増やして再試験を行った。

検量線作成記録（追加試験）

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。

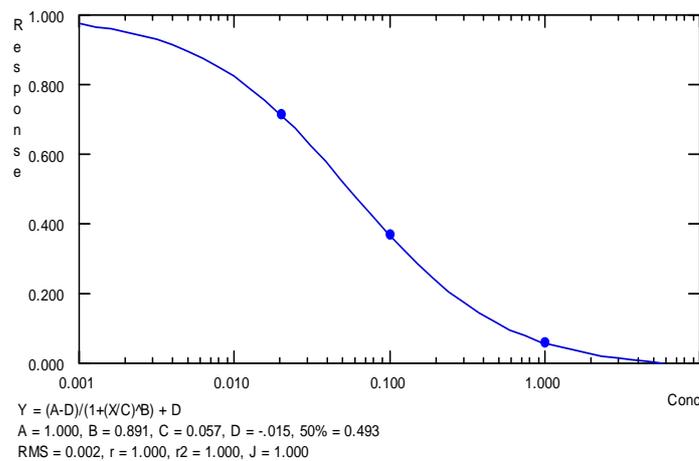
表 5.1.4 「測定範囲試験」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液				
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	
所定濃度	g/L	0	20	100	1000	
実測回数	回	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0* (吸光度)	1	-	0.967 (1.524)	0.696 (1.097)	0.341 (0.537)	0.057 (0.158)
	2	-	0.980 (1.545)	0.701 (1.105)	0.350 (0.551)	0.055 (0.189)
	3	-	1.053 (1.661)	0.743 (1.172)	0.414 (0.652)	0.062 (0.176)

\* 添付標準 0 μg/L の平均吸光度を B0 とした。

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	R <sup>2</sup>
値	1.000	0.891	0.057	-0.015	1.000



試験結果記録（追加試験）

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 「測定範囲試験」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 SA	溶液 S2	溶液 SB	溶液 S3	
調製濃度	μg/L	20	50	100	500	1000	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0* (吸光度)	1	-	0.642 (1.012)	0.478 (0.754)	0.356 (0.561)	0.112 (0.176)	0.059 (0.093)
	2	-	0.681 (1.074)	0.497 (0.784)	0.367 (0.578)	0.117 (0.184)	0.055 (0.087)
	3	-	0.672 (1.060)	0.480 (0.757)	0.361 (0.569)	0.137 (0.216)	0.069 (0.108)
	平均	-	0.665 (1.049)	0.485 (0.765)	0.361 (0.570)	0.122 (0.192)	0.061 (0.096)
換算値	1	μg/L	29	61	106	507	987
	2	μg/L	24	56	101	482	1052
	3	μg/L	25	60	103	400	852
	平均	μg/L	25.8	58.9	103	463	964
標準偏差**	μg/L	2.7 (0.033)	2.7 (0.017)	2.6 (0.0085)	56.0 (0.021)	102 (0.011)	
変動係数**	%	10.5 (3.1)	4.6 (2.2)	2.6 (1.5)	12.1 (11.0)	10.6 (11.2)	
相対値***	%	129	118	103	93	96	

\* 添付標準 0 μg/L の平均吸光度を B0 とした。

\*\* カッコ内は吸光度から求めた値。

\*\*\* 調整濃度を 100% とした時の各実測濃度（3 重測定の平均値）との割合（%）

評 価

メーカーが指定する検量線用 3 濃度系列，試験用 3 濃度系列で測定範囲を検討した場合，中間調整濃度の 100 μg/L では変動係数，相対値ともに良好な結果が得られた。しかし，低濃度側の 20 μg/L では，吸光度による変動係数は 11.6%であったが，濃度換算後の変動係数は 58.5%となり相対値も 60%であった（ばらつきの主な原因は，検量線の曲線部分での濃度測定によると考えられる）。そこで，試験用を 5 濃度系列にして再試験したところ，50 μg/L で変動係数 4.6%，相対値 118%と良好な結果が得られた。これらの結果から，測定範囲は 50 ~ 1000 μg/L と判断される。

(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。

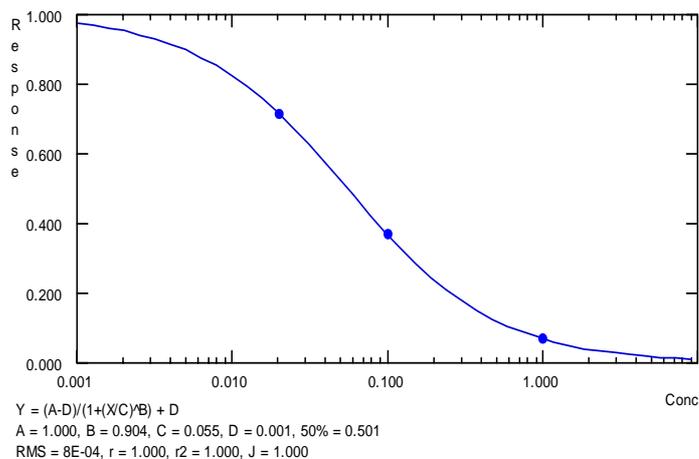
表 5.1.7 「検出下限および定量下限試験」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液				
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	
所定濃度	μg/L	0	20	100	1000	
実測回数	回	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0* (吸光度)	1	-	0.949 (1.516)	0.736 (1.175)	0.388 (0.619)	0.064 (0.102)
	2	-	0.994 (1.588)	0.718 (1.147)	0.357 (0.570)	0.063 (0.101)
	3	-	1.057 (1.689)	0.693 (1.107)	0.366 (0.584)	0.080 (0.128)

\* 添付標準 0 μg/L の平均吸光度を B0 とした。

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	R <sup>2</sup>
値	1.000	0.904	0.055	0.001	1.000



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 「検出下限および定量下限試験」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	20	20	20	20	20	20	20	20	
実測回数	回	1	2	3	4	5	6	7	8	
ELISA 実測 B/B0* (吸光度)	1	-	0.724 (1.156)	0.738 (1.179)	0.749 (1.196)	0.891 (1.423)	0.742 (1.186)	0.769 (1.228)	0.838 (1.339)	0.826 (1.320)
	2	-	0.774 (1.236)	0.723 (1.155)	0.732 (1.170)	0.722 (1.153)	0.672 (1.073)	0.736 (1.175)	0.770 (1.230)	0.752 (1.202)
	3	-	0.721 (1.152)	0.772 (1.233)	0.720 (1.150)	0.739 (1.180)	0.647 (1.033)	0.704 (1.124)	0.651 (1.040)	0.740 (1.182)
	平均	-	0.739 (1.182)	0.744 (1.189)	0.734 (1.172)	0.784 (1.252)	0.687 (1.098)	0.736 (1.176)	0.753 (1.203)	0.773 (1.235)
換算値	μg/L	17.4	16.9	18.0	13.3	23.1	17.7	16.0	14.2	
平均**	μg/L	17.1 (1.189)								
標準偏差**	μg/L	3.0 (0.047)								
変動係数**	%	17.4 (3.9)								

\* 添付標準 0 μg/L の平均吸光度を B0 とした。

\*\* カッコ内は吸光度から求めた値。

上表の標準偏差から求めた検出下限および定量下限は，以下のとおりである。

$$\text{検出下限 (3SD)} = 9.0 \mu\text{g/L}$$

$$\text{定量下限 (10SD)} = 30 \mu\text{g/L}$$

評価

メーカーが申請する下限濃度 (20μg/L) を用いた試験結果より，標準偏差 (SD) から求めた検出下限 (3SD) および定量下限は，それぞれ 9.0μg/L および 30μg/L となった。この結果は，変動係数から判断された測定範囲 ( (1)- ) の下限 (50μg/L) と多少異なるが，5濃度系列では 30μg/L を測定していない点を考慮すれば，定量下限は 30 ~ 50μg/L 付近に存在すると判断される。

(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。

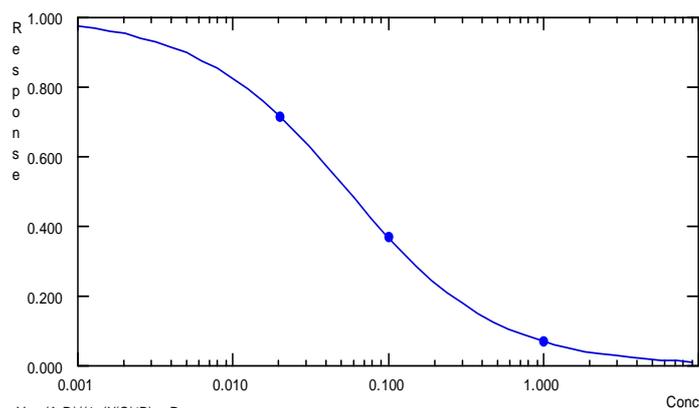
表 5.1.10 「繰返し再現性試験」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液				
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	
所定濃度	μg/L	0	20	100	1000	
実測回数	回	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0* (吸光度)	1	-	0.949 (1.516)	0.736 (1.175)	0.388 (0.619)	0.064 (0.102)
	2	-	0.994 (1.588)	0.718 (1.147)	0.357 (0.570)	0.063 (0.101)
	3	-	1.057 (1.689)	0.693 (1.107)	0.366 (0.584)	0.080 (0.128)

\* 添付標準 0 μg/L の平均吸光度を B0 とした。

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	R <sup>2</sup>
値	1.000	0.904	0.055	0.001	1.000



Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D  
A = 1.000, B = 0.904, C = 0.055, D = 0.001, 50% = 0.501  
RMS = 8E-04, r = 1.000, r2 = 1.000, J = 1.000

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 5.1.12 「繰返し再現性試験」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	100	100	100	100	100	100	100	100		
実測回数	回	1	2	3	4	5	6	7	8		
ELISA 実測 B/B0* (吸光度)	吸光度	1	-	0.367 (0.586)	0.382 (0.610)	0.359 (0.573)	0.391 (0.625)	0.344 (0.549)	0.311 (0.497)	0.359 (0.573)	0.374 (0.597)
		2	-	0.363 (0.580)	0.349 (0.557)	0.313 (0.500)	0.376 (0.600)	0.287 (0.459)	0.268 (0.428)	0.328 (0.524)	0.339 (0.541)
		3	-	0.337 (0.538)	0.311 (0.497)	0.330 (0.527)	0.398 (0.635)	0.319 (0.509)	0.319 (0.510)	0.328 (0.523)	0.369 (0.523)
		平均	-	0.356 (0.568)	0.347 (0.555)	0.334 (0.534)	0.388 (0.620)	0.317 (0.506)	0.300 (0.479)	0.338 (0.540)	0.360 (0.576)
	換算値	μg/L	106.5	110.9	118.4	91.2	129.2	141.3	116.0	104.0	
平均**	μg/L	114.7 (0.547)									
標準偏差**	μg/L	15.5 (0.044)									
変動係数**	%	13.5 (8.0)									

\* 添付標準 0 μg/L の平均吸光度を B0 とした。

\*\* カッコ内は吸光度から求めた値。

評価

調整濃度 100μg/L で 8 回繰返し試験の変動係数は 13.5% となり，繰返し再現性は良好と判断される。

(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。

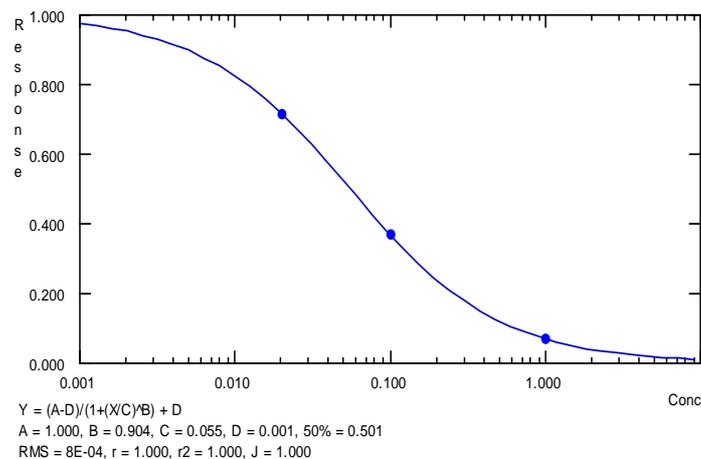
表 5.1.13 「日間再現性試験1日目」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液				
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	
所定濃度	μg/L	0	20	100	1000	
実測回数	回	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0* (吸光度)	1	-	0.949 (1.516)	0.736 (1.175)	0.388 (0.619)	0.064 (0.102)
	2	-	0.994 (1.588)	0.718 (1.147)	0.357 (0.570)	0.063 (0.101)
	3	-	1.057 (1.689)	0.693 (1.107)	0.366 (0.584)	0.080 (0.128)

\* 添付標準 0 μg/L の平均吸光度を B0 とした。

表 5.1.14 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	R <sup>2</sup>
値	1.000	0.904	0.055	0.001	1.000



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。

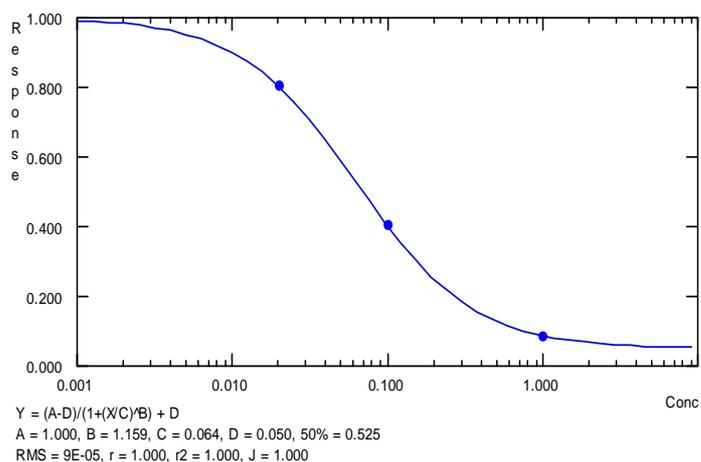
表 5.1.15 「日間再現性試験3日目」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液				
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	
所定濃度	μg/L	0	20	100	1000	
実測回数	回	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0' (吸光度)	1	-	1.050 (1.555)	0.746 (1.104)	0.398 (0.589)	0.084 (0.124)
	2	-	1.132 (1.676)	0.835 (1.236)	0.412 (0.610)	0.091 (0.135)
	3	-	0.817 (1.210)	0.828 (1.225)	0.400 (0.592)	0.087 (0.128)

\* 添付標準 0 μg/L の平均吸光度を B0 とした。

表 5.1.16 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	R <sup>2</sup>
値	1.000	1.159	0.064	0.050	1.000



本製品における5日目の検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

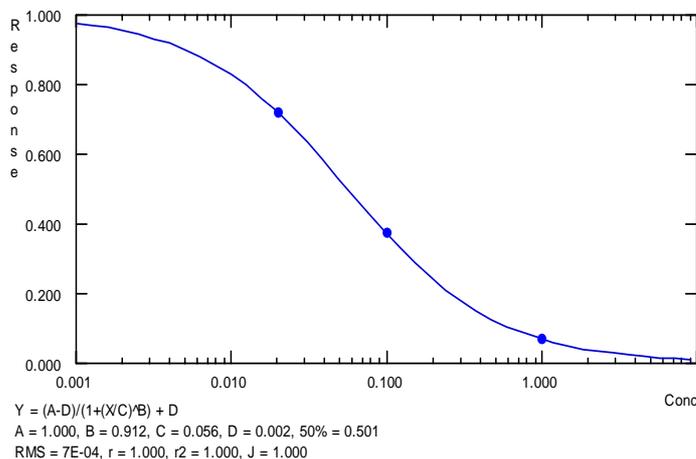
表 5.1.17 「日間再現性試験5日目」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液				
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	
所定濃度	μg/L	0	20	100	1000	
実測回数	回	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0' (吸光度)	1	-	1.059 (1.567)	0.703 (1.040)	0.386 (0.572)	0.069 (0.103)
	2	-	0.934 (1.383)	0.755 (1.117)	0.377 (0.559)	0.077 (0.114)
	3	-	1.007 (1.490)	0.701 (1.038)	0.355 (0.525)	0.063 (0.093)

\* 添付標準 0 μg/L の平均吸光度を B0 とした。

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	R <sup>2</sup>
値	1.000	0.912	0.056	0.002	1.000



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 5.1.19 「日間再現性試験」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					
		1日	3日	5日	1日	3日	5日	1日	3日	5日			
調製濃度	μg/L	20	20	20	100	100	100	1000	1000	1000			
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	3	3	3			
ELISA実測 B <sub>0</sub> (吸光度)	1	-	0.760 (1.214)	0.715 (1.058)	0.694 (1.027)	0.334 (0.533)	0.376 (0.557)	0.330 (0.489)	0.057 (0.090)	0.091 (0.134)	0.069 (0.103)		
	2	-	0.916 (1.464)	0.738 (1.092)	0.638 (0.944)	0.319 (0.510)	0.378 (0.560)	0.360 (0.533)	0.052 (0.082)	0.084 (0.124)	0.055 (0.082)		
	3	-	0.748 (1.195)	0.743 (1.100)	0.659 (0.976)	0.363 (0.580)	0.391 (0.579)	0.355 (0.421)	0.068 (0.108)	0.100 (0.148)	0.051 (0.076)		
	平均	-	0.808 (1.291)	0.732 (1.084)	0.664 (0.982)	0.339 (0.541)	0.382 (0.566)	0.325 (0.481)	0.059 (0.094)	0.092 (0.136)	0.058 (0.087)		
換算値	μg/L	11	29	27	116	109	126	1208	914	1225			
平均**	μg/L		22.2 (1.119)			116.9 (0.529)			1116 (0.105)				
標準偏差**	μg/L		9.5 (0.158)			8.3 (0.044)			175 (0.027)				
変動係数**	%		43.0 (14.1)			7.1 (8.3)			15.7 (25.2)				

\* 添付標準 0 μg/L の平均吸光度を B<sub>0</sub> とした。

\*\* カッコ内は吸光度から求めた値。

評価

同一週の3日間に測定した場合の変動係数は、調整濃度 100μg/L で 7.1%、1000μg/L で 15.7%となり、概ね良好な結果が得られた。しかし、調整濃度が 20μg/L の場合には、(1)- の場合と同様のばらつきにより 43.0%となった。したがって、低濃度側を除けば日間再現性は良好と判断される。

(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。

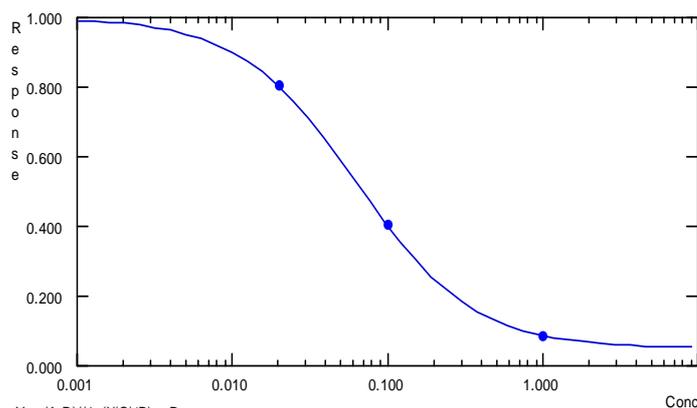
表 5.1.20 「期間再現性試験最初」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液				
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	
所定濃度	μg/L	0	20	100	1000	
実測回数	回	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0* (吸光度)	1	-	1.050 (1.555)	0.746 (1.104)	0.398 (0.589)	0.084 (0.124)
	2	-	1.132 (1.676)	0.835 (1.236)	0.412 (0.610)	0.091 (0.135)
	3	-	0.817 (1.210)	0.828 (1.225)	0.400 (0.592)	0.087 (0.128)

\* 添付標準 0 μg/L の平均吸光度を B0 とした。

表 5.1.21 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	R <sup>2</sup>
値	1.000	1.159	0.064	0.050	1.000



Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D  
A = 1.000, B = 1.159, C = 0.064, D = 0.050, 50% = 0.525  
RMS = 9E-05, r = 1.000, r2 = 1.000, J = 1.000

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。

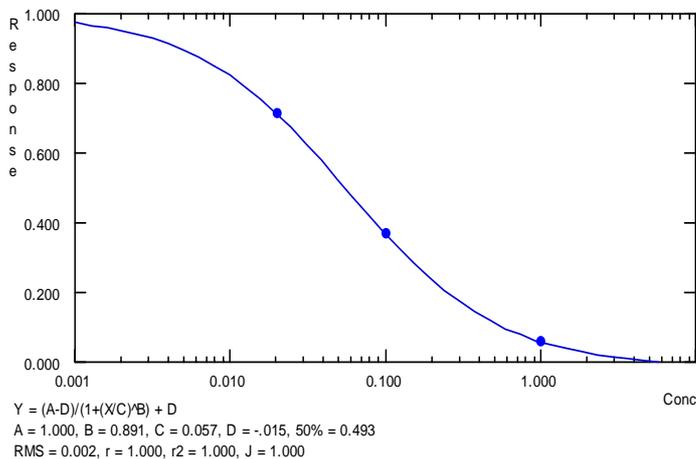
表 5.1.22 「期間再現性試験1ヶ月目」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液				
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	
所定濃度	μg/L	0	20	100	1000	
実測回数	回	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0' (吸光度)	1	-	0.967 (1.524)	0.696 (1.097)	0.341 (0.537)	0.057 (0.158)
	2	-	0.980 (1.545)	0.701 (1.105)	0.350 (0.551)	0.055 (0.189)
	3	-	1.053 (1.661)	0.743 (1.172)	0.414 (0.652)	0.062 (0.176)

\* 添付標準 0 μg/L の平均吸光度を B0 とした。

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	R <sup>2</sup>
値	1.000	0.891	0.057	-0.015	1.000



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 5.1.24 「期間再現性試験」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	
		最初	1ヶ月	最初	1ヶ月	最初	1ヶ月
調製濃度	μg/L	20	20	100	100	1000	1000
実測回数	回	3	3	3	3	3	3
E L I S A 実測 B <sub>0</sub> (吸光度)	1	0.715 (1.058)	0.642 (1.012)	0.376 (0.557)	0.356 (0.561)	0.091 (0.134)	0.059 (0.093)
	2	0.738 (1.092)	0.681 (1.074)	0.378 (0.560)	0.367 (0.578)	0.084 (0.124)	0.055 (0.087)
	3	0.743 (1.100)	0.672 (1.060)	0.391 (0.579)	0.361 (0.569)	0.100 (0.148)	0.0690 (0.108)
	平均	0.732 (1.084)	0.665 (1.049)	0.382 (0.566)	0.361 (0.570)	0.092 (0.136)	0.061 (0.096)
	換算値	μg/L	29	26	109	103	914
平均**	μg/L	28.6 (1.084)	25.8 (1.049)	109.4 (0.566)	103.3 (0.570)	934.1 (0.136)	963.8 (0.096)
標準偏差**	μg/L	1.9 (0.022)	2.7 (0.033)	3.5 (0.012)	2.6 (0.009)	162.7 (0.012)	101.9 (0.011)
変動係数**	%	6.8 (2.1)	10.5 (3.1)	3.2 (2.1)	2.6 (1.5)	17.4 (8.9)	10.6 (11.2)

\* 添付標準 0 μg/L の平均吸光度を B<sub>0</sub> とした。

\*\* カッコ内は吸光度から求めた値。

評 価

1ヶ月を隔てて2回測定した場合の変動係数は，調整濃度 20μg/L で 6.8% 10.5%，100μg/L で 3.2% 2.6%，1000μg/L で 17.4% 10.6%となり（いずれも，矢印前は最初，後は1ヵ月後），この場合には調整濃度 20μg/L でも良好であった。したがって期間再現性は概ね良好と判断される。

(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。

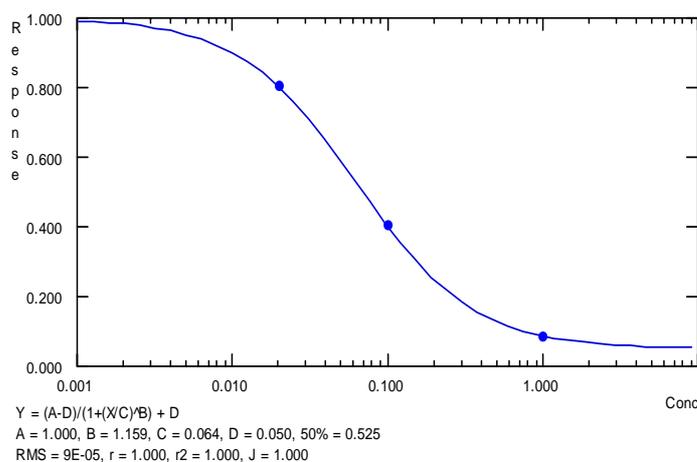
表 5.1.25 「プレート間再現性試験プレートA」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液				
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	
所定濃度	μg/L	0	20	100	1000	
実測回数	回	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0* (吸光度)	1	-	1.050 (1.555)	0.746 (1.104)	0.398 (0.589)	0.084 (0.124)
	2	-	1.132 (1.676)	0.835 (1.236)	0.412 (0.610)	0.091 (0.135)
	3	-	0.817 (1.210)	0.828 (1.225)	0.400 (0.592)	0.087 (0.128)

\* 添付標準 0 μg/L の平均吸光度を B0 とした。

表 5.1.26 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	R <sup>2</sup>
値	1.000	1.159	0.064	0.050	1.000



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。

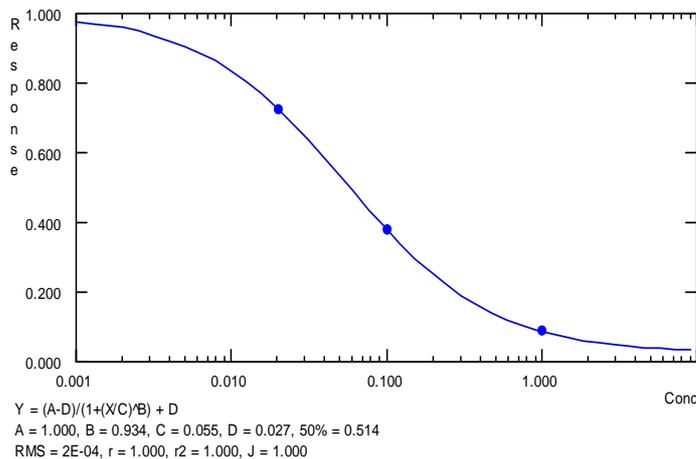
表 5.1.27 「プレート間再現性試験プレートB」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液				
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	
所定濃度	μg/L	0	20	100	1000	
実測回数	回	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0' (吸光度)	1	-	1.013 (1.680)	0.746 (1.238)	0.372 (0.617)	0.089 (0.147)
	2	-	1.001 (1.660)	0.711 (1.180)	0.385 (0.639)	0.083 (0.138)
	3	-	0.986 (1.636)	0.724 (1.201)	0.384 (0.636)	0.091 (0.150)

\* 添付標準 0 μg/L の平均吸光度を B0 とした。

表 5.1.28 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	R <sup>2</sup>
値	1.000	0.934	0.055	0.027	1.000



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。

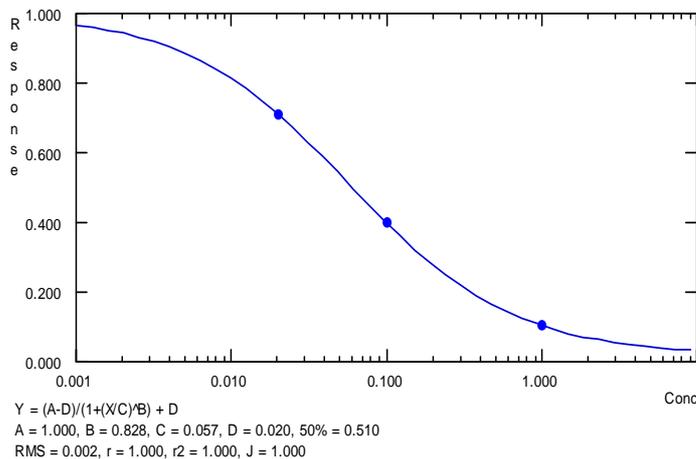
表 5.1.29 「プレート間再現性試験プレートC」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液				
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	
所定濃度	μg/L	0	20	100	1000	
実測回数	回	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0' (吸光度)	1	-	0.998 (0.951)	0.668 (0.636)	0.388 (0.369)	0.097 (0.092)
	2	-	1.003 (0.956)	0.718 (0.684)	0.412 (0.392)	0.104 (0.099)
	3	-	0.998 (0.951)	0.747 (0.712)	0.398 (0.379)	0.110 (0.104)

\* 添付標準 0 μg/L の平均吸光度を B0 とした。

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	R <sup>2</sup>
値	1.000	0.828	0.057	0.020	1.000



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 5.1.31 「プレート間再現性試験」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		
		プレート A	プレート B	プレート C	プレート A	プレート B	プレート C	プレート A	プレート B	プレート C
調整濃度	μg/L	20	20	20	100	100	100	1000	1000	1000
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	3	3	3
E I S A 実測 B/B0 (吸光度)	1	0.715 (1.058)	0.745 (1.235)	0.809 (0.771)	0.376 (0.557)	0.381 (0.631)	0.419 (0.399)	0.091 (0.134)	0.098 (0.162)	0.093 (0.088)
	2	0.738 (1.092)	0.695 (1.153)	0.820 (0.781)	0.378 (0.560)	0.394 (0.653)	0.428 (0.408)	0.084 (0.124)	0.100 (0.166)	0.102 (0.097)
	3	0.743 (1.100)	0.719 (1.193)	0.858 (0.817)	0.391 (0.579)	0.381 (0.631)	0.416 (0.396)	0.100 (0.148)	0.104 (0.172)	0.102 (0.097)
	平均	0.732 (1.084)	0.720 (1.194)	0.829 (0.790)	0.382 (0.566)	0.385 (0.639)	0.421 (0.401)	0.092 (0.136)	0.101 (0.167)	0.099 (0.094)
換算値	μg/L	29	21	9	109	98	89	914	802	1077
平均**	μg/L	19.4 (1.023)			98.8 (0.535)			931 (0.132)		
標準偏差**	μg/L	10.0 (0.209)			10.3 (0.122)			139 (0.036)		
変動係数**	%	51.6 (20.4)			10.4 (22.7)			14.9 (27.5)		

プレート A, B は同一ロット, プレート C は異ロット。

\* 添付標準 0 μg/L の平均吸光度を B0 とした。

\*\* カッコ内は吸光度から求めた値。

評価

同ロットプレート 2 枚, 異ロットプレート 1 枚を用いて測定した場合の変動係数は, 調整濃度 100μg/L で 10.4%, 1000μg/L で 14.9% となり, 概ね良好な結果が得られた。しかし, 調整濃度が 20μg/L の場合には, (1)- の場合と同様のばらつきにより 51.6% となった。したがって, 低濃度側を除けばプレート間再現性は良好と判断される。

(7) 交差反応性

検量線作成記録

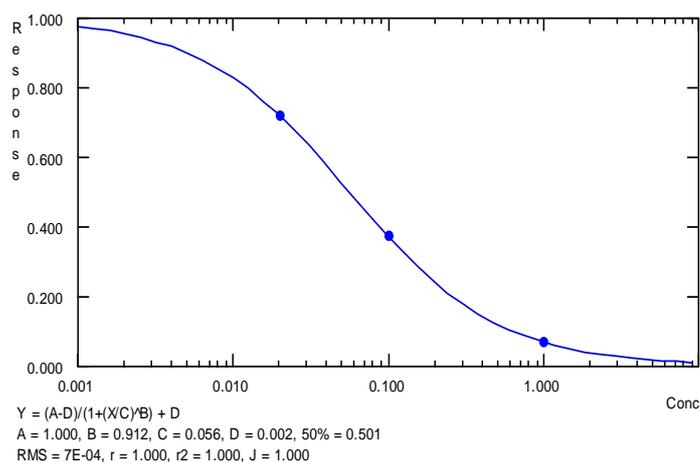
表 5.1.32 「交差反応性試験」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液				
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	
所定濃度	μg/L	0	20	100	1000	
実測回数	回	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0* (吸光度)	1	-	1.059 (1.567)	0.703 (1.040)	0.386 (0.572)	0.069 (0.103)
	2	-	0.934 (1.383)	0.755 (1.117)	0.377 (0.559)	0.077 (0.114)
	3	-	1.007 (1.490)	0.701 (1.038)	0.355 (0.525)	0.063 (0.093)

\* 添付標準 0 μg/L の平均吸光度を B0 とした。

表 5.1.33 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	R <sup>2</sup>
値	1.000	0.912	0.056	0.002	1.000



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 5.1.34 「交差反応性試験」対象物質の交差反応率

	LAS	DS	BS
50%阻害濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	46	5300	55000
交差率(%)	100	0.9	<0.1

表 5.1.35 「交差反応性試験」対象物質試料溶液の測定データ

LAS		0 $\mu\text{g/L}$	20 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	1000 $\mu\text{g/L}$		
ELISA 実測 B/B0* (吸光度)	1	1.002 (1.483)	0.694 (1.027)	0.330 (0.489)	0.069 (0.103)		
	2	0.989 (1.464)	0.638 (0.944)	0.360 (0.533)	0.055 (0.082)		
	3	0.948 (1.403)	0.659 (0.976)	0.284 (0.421)	0.051 (0.076)		
平均		0.980 (1.450)	0.664 (0.982)	0.325 (0.481)	0.058 (0.087)		
標準偏差		0.028 (0.042)	0.028 (0.042)	0.038 (0.056)	0.0096 (0.014)		
CV (%)**		2.9	4.3	11.7	16.4		
DS		0 $\mu\text{g/L}$	20 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	1000 $\mu\text{g/L}$	10000 $\mu\text{g/L}$	
ELISA 実測 B/B0* (吸光度)	1	1.005 (1.488)	0.968 (1.433)	0.822 (1.216)	0.844 (1.249)	0.363 (0.537)	
	2	0.926 (1.370)	0.927 (1.372)	0.880 (1.302)	0.803 (1.188)	0.363 (0.538)	
	3	0.968 (1.432)	1.027 (1.520)	0.916 (1.356)	0.876 (1.297)	0.394 (0.583)	
平均		0.966 (1.430)	0.974 (1.441)	0.972 (1.291)	0.841 (1.244)	0.373 (0.552)	
標準偏差		0.040 (0.059)	0.050 (0.074)	0.048 (0.071)	0.037 (0.055)	0.018 (0.026)	
CV (%)**		4.1	5.2	5.5	4.4	4.8	
BS		0 $\mu\text{g/L}$	20 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	1000 $\mu\text{g/L}$	10000 $\mu\text{g/L}$	100000 $\mu\text{g/L}$
ELISA 実測 B/B0* (吸光度)	1	0.943 (1.396)	0.891 (1.318)	0.807 (1.195)	0.809 (1.197)	0.841 (1.245)	0.355 (0.525)
	2	0.943 (1.395)	0.917 (1.357)	0.823 (1.218)	0.846 (1.252)	0.923 (1.366)	0.350 (0.519)
	3	0.949 (1.404)	0.977 (1.446)	0.895 (1.325)	0.909 (1.346)	0.878 (1.300)	0.346 (0.512)
平均		0.945 (1.398)	0.928 (1.373)	0.842 (1.246)	0.855 (1.265)	0.881 (1.303)	0.350 (0.518)
標準偏差		0.0033 (0.0049)	0.044 (0.066)	0.047 (0.069)	0.051 (0.075)	0.041 (0.061)	0.0044 (0.0065)
CV (%)**		0.4	4.8	5.6	6.0	4.6	1.3

\* 添付標準0  $\mu\text{g/L}$ の平均吸光度をB0とした。

\*\* 吸光度から求めた値

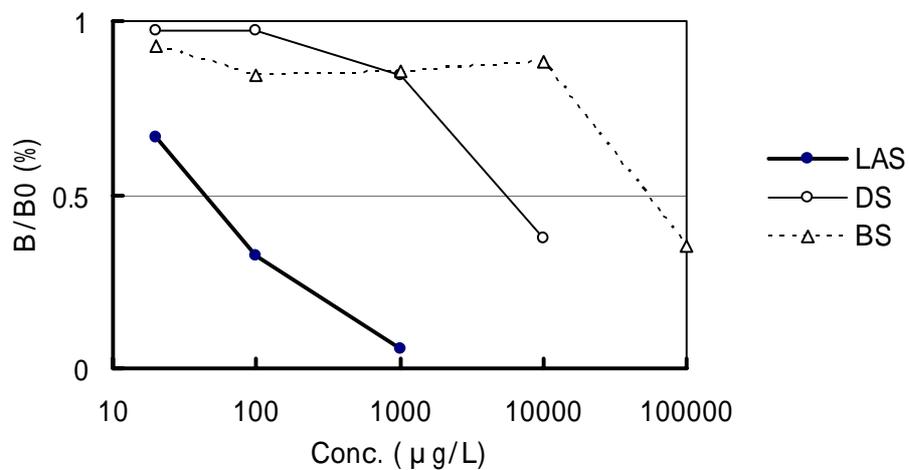


図 5.1.1 交差反応性試験結果

LAS : 直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム

DS : ドデシル硫酸ナトリウム

BS : ベンゼンスルホン酸ナトリウム

評価

2 類似物質の交差反応率は、ドデシル硫酸ナトリウム 0.9%、ベンゼンスルホン酸ナトリウム <math><0.1\%</math>となり、メーカー申請データと類似の結果が得られた。

## 5.2 実用的な性能

### (1) 回収特性

#### 検量線作成記録

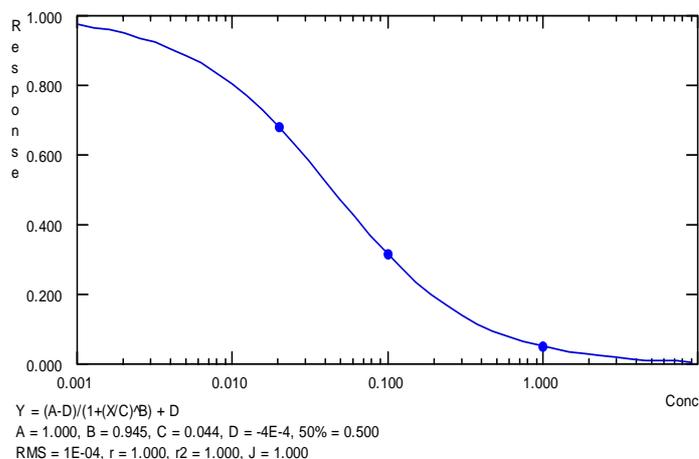
表 5.2.1 「回収特性試験」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液				
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	
所定濃度	μg/L	0	20	100	1000	
実測回数	回	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0* (吸光度)	1	-	1.008 (1.747)	0.672 (1.164)	0.331 (0.574)	0.052 (0.090)
	2	-	1.003 (1.737)	0.700 (1.213)	0.305 (0.528)	0.048 (0.083)
	3	-	0.989 (1.713)	0.667 (1.156)	0.314 (0.544)	0.049 (0.086)

\* 添付標準 0 μg/L の平均吸光度を B0 とした。

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	R <sup>2</sup>
値	1.000	0.945	0.044	0	1.000



## 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 5.2.3 「回収特性試験」対象物質試料溶液の測定データ

項目	単位	河川ろ過水 (LAS 100 µg/L 添加) <sup>5)</sup>					
		0	1	5	10	50	
フミン酸ナトリウム濃度 <sup>1)</sup>	mg/L	0	1	5	10	50	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0 <sup>2)</sup> (吸光度)	1	-	0.331 (0.574)	0.294 (0.509)	0.182 (0.315)	0.163 (0.283)	0.080 (0.139)
	2	-	0.306 (0.531)	0.266 (0.462)	0.180 (0.313)	0.148 (0.257)	0.083 (0.144)
	3	-	0.309 (0.535)	0.299 (0.518)	0.198 (0.343)	0.147 (0.255)	0.077 (0.133)
	平均	-	0.315 (0.546)	0.286 (0.496)	0.187 (0.323)	0.153 (0.265)	0.080 (0.138)
換算値	1	µg/L	92.6	111	216	248	584
	2	µg/L	105	128	218	280	560
	3	µg/L	103	109	194	283	614
	平均	µg/L	100.1	116.1	209.4	270.5	585.9
標準偏差 <sup>3)</sup>	µg/L	6.6 (0.024)	10.8 (0.030)	13.7 (0.017)	19.3 (0.016)	27.0 (0.0055)	
変動係数 <sup>3)</sup>	%	6.6 (4.3)	9.3 (6.1)	6.5 (5.2)	7.1 (5.9)	4.6 (4.9)	
回収影響率 <sup>4)</sup>	%	100	116	209	271	586	

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) 添付標準0µg/Lの平均吸光度をB0とした。

3) カッコ内は吸光度から求めた値。

4) 原水(夢前川京見橋河川水)中の濃度0.90µg/Lを除いて算出した値。

5) 夢前川京見橋河川水。

## 評価

対象物質であるLAS 100µg/Lを河川ろ過水(LAS濃度0.90µg/L)に添加し、一定濃度のフミン酸ナトリウム共存の影響を試験した結果、フミン酸ナトリウム1mg/Lまでは大きな影響はみられなかったが、それより高濃度側で強い正の妨害が認められた。したがって、フミン質が高濃度に含まれる環境水の場合や、環境水を濃縮して用いる場合には、正の妨害を考慮する必要がある。

(2) 測定精度等

検量線作成記録

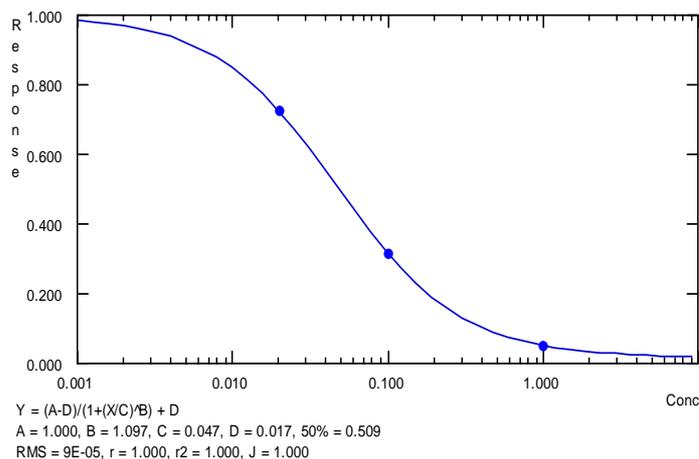
表 5.2.4 「測定精度等試験」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液				
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	
所定濃度	μg/L	0	20	100	1000	
実測回数	回	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0* (吸光度)	1	-	0.993 (1.715)	0.703 (1.214)	0.324 (0.560)	0.053 (0.091)
	2	-	0.966 (1.668)	0.735 (1.269)	0.306 (0.529)	0.046 (0.079)
	3	-	1.041 (1.798)	0.733 (1.266)	0.319 (0.550)	0.053 (0.091)

\* 添付標準 0 μg/L の平均吸光度を B0 とした。

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	R <sup>2</sup>
値	1.000	1.097	0.047	0.017	1.000



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 5.2.6 「測定精度等試験」対象物質試料溶液のELISAおよびLC/MS/MS測定データ

項目	単位	河川水			
		庄下川 庄下川橋	猪名川 利倉橋	夢前川 京見橋	
前処理での濃縮倍率	倍	10	10	100	
実測回数	回	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0* (吸光度)	1	-	0.539 (0.931)	0.315 (0.543)	0.309 (0.533)
	2	-	0.510 (0.880)	0.261 (0.451)	0.28 (0.567)
	3	-	0.552 (0.954)	0.363 (0.580)	0.286 (0.493)
	平均	-	0.534 (0.922)	0.276 (0.490)	0.059 (0.531)
ELISA 測定濃度 (換算値)	1	μg/L	4.2	10.1	1.0
	2	μg/L	4.7	12.9	0.95
	3	μg/L	4.0	12.0	1.2
	平均	μg/L	4.3	11.7	1.0
標準偏差**	μg/L	0.35 (0.038)	1.45 (0.048)	0.10 (0.037)	
変動係数**	%	8.3 (4.1)	12.4 (9.7)	9.6 (7.0)	
LC/MS/MS 測定濃度	μg/L	1.9	2.1	0.90	

\* 添付標準 0 μg/L の平均吸光度を B0 とした。

\*\* カッコ内は吸光度から求めた値。

ELISA の検出下限は 9.0 μg/L , 定量下限は 30 μg/L

LC/MS/MS の検出下限は 0.049 μg/L , 定量下限は 0.15 μg/L

評価

メーカー推奨の前処理法（固相抽出）を用いることにより、3 河川水全てにおいて、本キットで LAS が検出できた（1.0~11.7μg/L）。しかし、LC/MS/MS 法による分析結果は 0.90~2.1μg/L であり、本キットによる測定値が大きくなる傾向がみられた。測定例が少数であることから断定的な判断はできないが、(2)- で検討されたように、河川水中の妨害物質やマトリックスの影響を考慮する必要がある。

## 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 項目の結果から、50 ~ 1000  $\mu\text{g/L}$  の濃度範囲においては概ね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

メーカー推奨の前処理(濃縮操作)を用いることにより、妥当な感度や精度が得られた。環境水中のマトリックスの影響に関する検討を行えば、実用化は可能である。

### (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、試料の前処理から測定結果が得られるまで 4 ~ 5 時間であり、同時に約 25 試料(3 重測定)の測定が可能となる。したがって、操作の簡便性は高いと言える。

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	日本エンバイロケミカルズ株式会社
技術・製品の名称	技術：ELISA法（酵素免疫測定法） 製品の名称： 環境汚染診断薬エコロジーナ 陰イオン界面活性剤LAS ELISAキット（マイクロプレート）

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）

日本エンバイロケミカルズ株式会社

代表取締役社長 小林 厚夫 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	日本エンバイロケミカルズ株式会社
	住所	〒105-0023 東京都港区芝浦 1-2-1 シーパンス N 館 9F
	担当者所属・氏名	事業開発室 室長 道正 伸
	電話番号	03-5444-9891
	FAX 番号	03-5444-9860
	E-mail アドレス	eco@jechem.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。

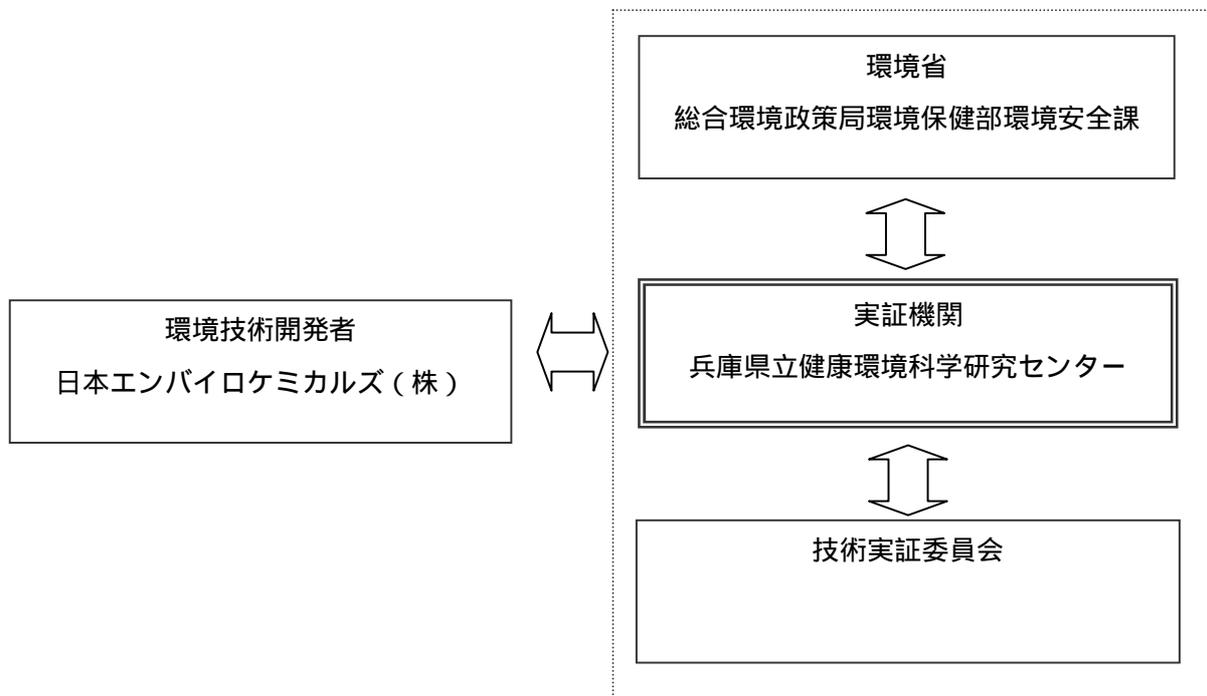


図1 実証試験の実施体制

## 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	事情開発室長	道正 伸
	実証対象製品の取扱説明書等の提供	研究開発部 リサーチマネジャー	藤本 茂
	実証試験実施上の参考情報の提供	研究開発部 リサーチマネジャー	藤本 茂

### 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、申請者が開発した陰イオン界面活性剤直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩（LAS）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：水質，底質）のLAS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（LAS濃度が高い試料では吸光度が低く，LAS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	環境汚染診断薬エコロジーナ 陰イオン界面活性剤 LAS ELISA キット（マイクロプレート）
型番	300-06051 《和光純薬工業(株)商品コード》
販売・製造元	《販売》和光純薬工業(株) 《製造》日本エンバイロケミカルズ(株)
重量（キット一式，g）	580g
価格（円）	
分析対象物質	直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩（LAS）
対象環境媒体	水質・底質・生物・その他（ ） 底質試料は抽出操作が必要
利用用途	環境試料中のLAS濃度の測定
標準試薬・種類	付属（調整済/調整要）直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム（ $C_{12}H_{25}C_6H_4SO_3Na$ ）10mg/L（10%メタノール溶液）
操作環境（室温）	15 ~ 30 （恒温槽（例 20 ）の使用が望ましい）
製品保管条件	2 ~ 8
製品保証期間	製造後 24 ヶ月間
同時測定数（最多）	43 試料（n=2 で 1 キット使用時）
測定時間	2.5 時間（固相抽出等の前処理時間を除く）

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	20 ~ 1000µg/L (添付資料：付録 2 LAS-1)
検出下限および定量下限	定量下限：20µg/L (B/B <sub>0</sub> % = 80±10%)
繰返し再現性	変動係数：7.3 ~ 11.8% (標準)，1.4 ~ 7.3% (河川水) (添付資料：付録 2 LAS-2)
日間再現性	変動係数：7.4 ~ 17.0% (河川水) (添付資料：付録 2 LAS-2)
期間再現性	標準偏差：(記載なし) 変動係数：(記載なし)
プレート間再現性	標準偏差：(記載なし) 変動係数：(記載なし)
交差反応性	類縁体との交差反応性 (添付資料：付録 2 LAS-3)
その他	自家管理検体%：Low=108.0%，High=111.2% (添付資料：付録 2 LAS-1)
2. 実用的な性能	
回収特性	河川水での添加回収率：78 ~ 109% (添付資料：付録 2 LAS-4)
測定精度等	機器分析との相関：ELISA = 0.84×HPLC-2.63 (R = 0.98) (添付資料：付録 2 LAS-4)
その他	
試験責任者	研究開発部 リサーチマネージャー 藤本 茂
試験年月日	平成 16 年 11 月 5 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 16 年 12 月～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	12 月				1 月
	4-5 週	1 週	2 週	3 週	4 週	2 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。
検出下限及び定量下限	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 \_\_\_\_\_ 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

保管温度（            ）

搬入時の温度管理

使用期限

その他異常なし

保管場所 \_\_\_\_\_

保管温度 \_\_\_\_\_

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・ラッ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

直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩（LAS）の市販標準物質（和光純薬社製 直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(DBS)）を用いて、10%メタノールを希釈溶媒として、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 (mg/L)
標準溶液指定濃度系列	キット付属 LAS 標準	0, 0.02, 0.1, 1
測定範囲 日間再現性 期間再現性 プレート間再現性	DBS	0, 0.02, 0.1, 1
検出下限および定量下限	DBS	0.02
繰返し再現性	DBS	0.1
交差反応性	ドデシル硫酸 ナトリウム ベンゼンスルホン 酸ナトリウム	0, 0.02, 0.1, 1, 10 0, 0.02, 0.1, 1, 10, 100

#### 測定範囲試験

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 $\mu$ 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ナトリウム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、フミン酸ナトリウム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：LAS	0.1
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、キットが推奨する前処理法(固相(C18 または tC18)カートリッジによる抽出 メタノールによる溶出 乾固 10%メタノール溶液：取扱説明書参照)で処理し LAS 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所長に報告する。

環境汚染診断薬エコロジーナ<sup>®</sup>  
陰イオン界面活性剤  
**LAS ELISA キット**  
(マイクロプレート)  
**使用説明書**

前文

陰イオン界面活性剤直鎖アルキルベンゼンスルホン酸(LAS)は、国内で年間約 15 万トン生産され<sup>1)</sup>、水道水質基準で 0.2mg/L 以下に規制されている陰イオン界面活性剤の大部分を占めています。LASの生分解性は比較的良好で人体への毒性もあまり高くありませんが、起泡性が高いため水道水質の管理上、監視の必要性が指摘されています。

環境水中の陰イオン界面活性剤測定法として、水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法(平成15年7月22日厚生労働省告示第261号、別表第24)では高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法が採用されていますが、この方法は抽出・濃縮操作を必要とします<sup>2)</sup>。

本品は、酵素免疫定量法(ELISA 法)により、環境水中の LAS を高感度かつ簡便に測定できるキットで、HPLC 法とも良好な相関が確認されています<sup>3)、4)</sup>。

## キットの特長

1. モノクローナル抗体を使用しているため、製造ロット間で抗体性能にばらつきがなく、環境水中の LAS を特異的に検出・測定できます。
2. 定量範囲は 0.02-1mg/L (ppm) と高感度です。
3. 試料水の前処理はろ過だけで簡便です<sup>注)</sup>。
4. 測定値の CV (変動係数) は 10% 以下で、ばらつきが少なく、高精度です。
5. 有機溶媒の使用量を低減できます。
6. 測定試料の調製から定量まで 2.5 時間で完了します。
7. 簡単な操作で多検体を同時に処理できるため、経済的です。

注) 測定対象により固相抽出等のクリーンアップ・濃縮が必要な場合があります。

## 測定原理 (競合 ELISA 法)

1. 競合反応  
LAS (抗原) と特異的に結合するたんぱく質 (抗体) が、マイクロプレート内面に塗布 (固相化) されています。  
前処理した試料水と、LAS に発色用酵素を結合させた試薬 (抗原酵素複合体) をマイクロプレートに加え、競合反応させます。
2. 発色反応  
競合反応後、洗浄により未反応物を除去し、発色基質を加えます。抗体に結合した抗原酵素複合体の発色用酵素のはたらきで発色基質が着色します。LAS 濃度が高い試料では、抗原酵素複合体の抗体への結合量が少ないため、着色が弱くなり、吸光度が低くなります。
3. 濃度の定量  
450nm での吸光度 (着色の度合い) と LAS 濃度との関係から標準曲線を作成します。これを用いて、試料中の LAS 濃度を定量します。

## キット構成内容

No.	品名	容量	数量	保存温度条件
	抗LASモノクローナル抗体固相化マイクロプレート	96 well	1枚	2~8
	LAS標準原液 (C12, 10mg/L 10%メタノール溶液)	4mL	1本	2~8
	抗原酵素複合体粉末	7mL用	2本	2~8
	抗原酵素複合体溶解液(白キャップ)	8mL	2本	2~8
	6倍濃縮洗浄液	50mL	1本	2~8
	発色基質溶液	250 $\mu$ L	1本	2~8
	発色基質希釈液(赤シール)	15mL	1本	2~8
	発色停止液(黒キャップ)	15mL	1本	2~8
	混合用マイクロプレート	96 well	1枚	室温
	プレートシール		1枚	
	使用説明書		1部	

### <キットの他に必要な試薬・器材>

器材例は推奨品であり、弊社で使用可否を確認しておりますが、これらに限定するものではありません。

固相抽出による濃縮が必要でないとき

- 1 ディスポーザブル培養試験管(例: 岩城硝子社製、品番 9831-1207)  
壁面への吸着を防ぐため、試験管は必ずディスポーザブル品を使用してください。
- 2 ガラス繊維フィルター(例: アドバンテック社製、品番 36481047, 47mm)およびろ過に必要な器具
- 3 マイクロピペット(20-200  $\mu$ L, 200-1000  $\mu$ L)(例: ギルソニピペットマン P-200, P-1000 総代理店: エムエス機器(株))  
およびチップ(例: ICN 社製スーパースティック 96NS 総代理店: 大日本製薬(株)ラボラトリ-プロダクツ部)
- 4 マルチチャンネルピペット(50-300  $\mu$ L)(例: ラボシステムズ社製マルチピペットデジタルマルチチャンネル 8チャンネル 総代理店: 大日本製薬(株)ラボラトリ-プロダクツ部)およびチップ(例: ICN 社製スーパースティック 96NS 総代理店: 大日本製薬(株)ラボラトリ-プロダクツ部)
- 5 プレートリーダー(測定波長 450nm)(例: サンライズリモート 和光純薬工業(株) MEシステム部)
- 6 ストップウォッチ(時計)
- 7 ストリップイジェクター(例: コーニングコースター社製、品番 2578)
- 8 メタノール(高速液体クロマトグラフ用)

固相抽出による濃縮が必要なとき

- 1-8 は共通
- 9 固相カートリッジ(例: J. T. Baker SPE カラム C18、品番 562-20014、和光純薬工業(株)取扱い) 例: Sep-Pak PS-2 N20131 Waters 取扱い)
- 10 1M 酢酸緩衝液(pH5)

## 測定時の一般的注意

- 本キットは、使用前に 30 分程度放置して、室温に戻してください。
- 異なるキットの試薬を組み合わせ使用しないでください。
- 試薬は凍結を避けて 2～8℃ で冷蔵保存し、使用期限の過ぎたものは使用しないでください。
- 試薬調製時・測定操作時は、試薬が直接皮膚や目に触れないよう、眼鏡や手術用ゴム手袋などの適切な保護具を使用してください。
- 精度管理のため、繰り返し測定 (n = 2) を推奨します。

## 測定法

### 1. 試料前処理 (ろ過など)

**濁りのない試料**     メタノールを添加し、10%(V/V)メタノール溶液とし、これを検液とします。

**濁りのある試料**     ガラス繊維ろ紙上でろ過し、ろ紙上の残渣は試料量の 10%のメタノールで洗浄します。洗浄液をろ液に合わせて 10%(V/V)メタノール溶液とし、これを検液とします。

**LAS が低濃度の試料**     上水試験方法(2001)に準じ、溶出溶媒にメタノール、固相カラムを用いて濃縮し、検液とします。

【固相抽出の例】<sup>(文献5)</sup>

1M 酢酸緩衝液 (pH5) を用い、試料 (ろ液) の pH を 5 に調整します。

メタノールおよび蒸留水であらかじめコンディショニングした固相 (C18) カートリッジに、1) で調製した試料を通水します。試料通水時は、器壁への吸着を避けるため、チューピングの使用は避け、注射筒等を使用することをおすすめします。

蒸留水で洗浄後、メタノールにより溶出します。

窒素パージ (窒素ガス吹き付け) 等により溶媒を除去します。

メタノールに溶解後、蒸留水を加えて、最終メタノール濃度を 10% とします。

本前処理は、APE ELISA キットおよび AE ELISA キットと併用可能です。

最新の試料前処理法については弊社ホームページ (<http://www.jechem.co.jp/eco>) をご確認ください。

### 2. LAS 標準液の調製

#### 1) 「LAS 標準原液」の 10 倍希釈

**!! 重要 !!**

**「LAS 標準原液 (10mg/L)」を 10%メタノールで 10 倍に希釈し、「1mg/L LAS 標準液 (10%メタノール溶液)」を調製します。**

## 2) LAS 標準液の調製

10倍希釈したLAS標準液と10%メタノール溶液を用いて、LAS標準液を調製します。

【調製例】

調製標準液	(mg/L)	1.0	0.1	0.02	0
10%メタノール	( $\mu$ L)	0	900	980	1000
<u>1mg/L LAS 標準液</u>	( $\mu$ L)	1000	100	20	0
調製液量	( $\mu$ L)	1000	1000	1000	1000

10倍希釈を省略し、「10mg/L LAS 標準液」を直接10%メタノールで希釈すると、ブランク以外すべての標準液が10倍高濃度となるため、LAS=0以外の吸光度が全て低くなります。標準液作成時には必ず10倍希釈を行ってください。

1mg/L LAS 標準液調製時はLASの壁面への吸着を防止するため、必要な濃度への希釈は必ず一段階とし、1)10%メタノール、2)「10mg/L LAS 標準液」の順で混合してください。

各濃度の標準液を作成する場合は、必ず10%メタノール溶液を先に分注し、1mg/L LAS 標準液を後から添加してください。添加順序を逆にとると、標準曲線を正確に作成できない場合があります。

標準液は必ず使用時に調製してください。保存使用はできません。

希釈容器はディスパーザブル培養試験管をおすすめします。

標準液調製時はボルテックスミキサー等の使用は避け、試験管を強く振らないでください。発泡を避けるためマイクロピペットを利用し、液中で吸入・排出を2~3回ゆっくりと繰り返して混合してください。

LAS標準液中のメタノールが揮散しますので、分取後お速やかにフタを固く閉め、冷蔵保存してください。使用しなかったLAS標準液および標準液は回収し、水系に直接廃棄しないでください(例：布や紙で吸い取り、焼却処理)。

## 3. 抗原酵素複合体溶液の調製

「抗原酵素複合体粉末」(1本)に、「抗原酵素複合体溶解液(白キャップ)」(8mL/本)のうち7mLを加えて溶解し、抗原酵素複合体溶液を調製します。

抗原酵素複合体溶液は冷蔵保存し、溶解後2週間以内に使用してください。

マイクロピペットを利用し、液中で吸入・排出を2~3回繰り返して混合してください。

抗原酵素複合体溶液を2本同時に使用する時は、あらかじめ混合してから使用してください。1本(7mL)で約50well分の測定ができます。

## 4. 混合液の調製

「混合用マイクロプレート」を用いて、抗原酵素複合体溶液100 $\mu$ L/wellに測定試料または各濃度のLAS標準液(いずれもメタノール濃度:10%)100 $\mu$ L/wellを添加し、混合液を調製します。

LASの壁面への吸着を防止するため、抗原酵素複合体溶液を先に、測定試料またはLAS標準液を後に分注してください。添加順序を逆にとると、標準曲線を正確に作成できない場合があります。

マイクロピペットあるいはマルチチャンネルピペットを利用し、液中で吸入・排出を2~3回繰り返して混合してください。また、泡立ちやすいので、分注の際は気泡が入らないようゆっくりと操作してください。

LAS濃度0の場合は10%メタノールを用いてください。

## 5. 抗原抗体反応

室温に戻した「抗LASモノクローナル抗体固相化マイクロプレート」に4.で調製した混合液を100 $\mu$ L/wellずつ分注し、液面が水平になるように端を軽くたたきます。

「プレートシール」を表面に貼り、室温(18~25 )で60分間反応させます。

マイクロプレートは、必要なwell数だけ使用することができるように、8wellずつのスプリットタイプになっています。未使用部分は乾燥剤とともにチャック付きラミネート袋に戻し、密封後、冷蔵保存しておけば次回も使用することができます。

測定誤差の原因になりますので、分注する際は泡が入らないように注意してください。

異物混入および蒸発防止のため、反応中はプレートシールでマイクロプレート上面を覆ってください。

反応中はマイクロプレートを静置してください。

18~30 の恒温槽を所有している場合は、一定温度での使用をおすすめします。

特に検体数が多い場合は、各検体の抗原抗体反応時間が一定になるように注意してください。

## 6. 「洗浄液」の調製

抗原抗体反応時間中に、「6倍濃縮洗浄液」と蒸留水を1:5の割合で混合し、洗浄液を調製します(例:20mLの「6倍濃縮洗浄液」に100mLの蒸留水を添加)。

分割使用の場合は、1回の測定に必要な量だけ分取して使用してください。1wellあたり約1.2mL(1プレートあたり約120mL)を調製の目安としてください。

一旦希釈した洗浄液は冷蔵保存し、希釈後1ヶ月以内に使用してください。

## 7. 未反応物の除去

プレートシールを取り、反応液を捨て、洗浄液300 $\mu$ L/wellを用いてwell内を3回洗浄します。3回目の洗浄液を捨てた後は、裏返したマイクロプレートをペーパータオル等の上で軽くたたいて(タッピング)、洗浄液を完全に除去します。

3回目の洗浄液を満たした状態で、次の「発色試薬」を調製すると効率的です。

測定誤差の原因になりますので、3回目の洗浄後はwellの底に洗浄液が残っていないことを確認してください。プレート裏面の汚れは吸光度の測定誤差の原因になりますので、触れないように注意してください。

反応液は回収し、水系に直接廃棄しないでください(例:布や紙へ吸引取り、焼却処理)。

## 8. 発色試薬の調製

「発色基質溶液」と「発色基質希釈液(赤シール)」を1:100の割合で混合し、発色試薬を調製します(例:12mLの「発色基質希釈液」に120 $\mu$ Lの「発色基質溶液」をチップの先で混合しながら添加)。

使用直前(15分以内)に調製してください。

発色基質希釈液を先に分注し、その後、発色基質溶液を混合してください。

1回の測定に必要な量だけ分取し、使用してください。8wellあたり約1mL(1プレートあたり約12mL)を調製の目安としてください。残りは速やかにフタを固く閉め、冷蔵保存してください。

希釈後の発色試薬は保存使用できません。

## 9. 発色反応

8. で調製した発色試薬を100 $\mu$ L/well加え、プレートシールを再び表面に貼って、室温(18~25 )で30分間反応させた後、「発色停止液(黒キャップ)」を100 $\mu$ L/well添加します。

18~30 の恒温槽を所有している場合は、一定温度での使用をおすすめします。

特に検体数が多い場合は、各検体の発色反応時間が一定になるように注意してください。

発色試薬を加えると青色に、発色停止液を加えると黄色に呈色します。

## 10. 比色および濃度計算

プレートリーダーを用い、波長 450nm で吸光度(OD)を測定します。  
方眼紙もしくはパソコンを利用し、検液中の LAS 濃度を算出します。検液中の LAS 濃度より、次式を用いて試料中の LAS 濃度を算出します。

$$\text{試料中の LAS 濃度}(\mu\text{g/L}) = \text{検液中の LAS 濃度}(\mu\text{g/L}) / 0.9 / \text{濃縮倍率}$$

(係数 0.9 は、添加した 10%(V/V)メタノール由来の補正係数)

発色反応停止後 15 分以内に測定してください。  
標準曲線は測定ごとに作成してください。  
マイクロプレートの裏面には触れないよう注意してください。

### LAS 濃度算出方法

#### 方眼紙利用:

LAS 0 $\mu\text{g/L}$  の時の OD を 100% として、各濃度での阻害率(B/B0%)を次式により算出します。

$$\text{阻害率 (B/B0\%)} = (\text{サンプルまたは標準液の OD}) / (\text{LAS 0}\mu\text{g/L の時の OD})$$

標準液の LAS 濃度 ( $\mu\text{g/L}$ ) と OD または B/B0% を両対数方眼紙 (または片対数方眼紙) にプロットして検量線を作成し、得られた検量線より検液中の LAS 濃度を算出します。

#### (測定例)

Standard OD or B/B0%

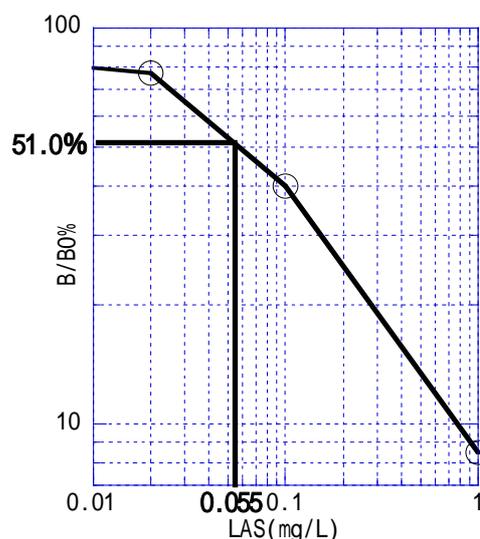
LAS(mg/L)	OD	B/B0%
0	1.312	100
0.02	1.010	77
0.1	0.525	40
1.0	0.105	8

方眼紙からの読み取り例

LAS (mg/L)	OD	B/B0%
0.055	(0.669)	51.0

Log-Log Graph Paper Calculation

LAS=0.055(mg/L) from B/B0%=51.0%



#### パソコン利用:

データ処理ソフトウェアを用いて 4-parameter logistic fitting 後、回帰式より検液中の LAS 濃度を算出します。

データ処理ソフトウェアの例

“デルタソフト” : BioMetallics, Inc., Princeton, NJ (<http://www.microplate.com>)

## 測定サンプル数(例)

添付の「抗LASモノクローナル抗体固相化マイクロプレート」には96のwellがあります。

例1)一括測定: LAS標準液として4系列(0, 0.02, 0.1, 1.0mg/L)を使用

LAS標準液として4系列をn=2で使用すると、残りのwell数は88となりますので、44サンプル(n=2)を一度に測定することができます。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	S5	S5	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37
B	0.02	0.02	S6	S6	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38
C	0.1	0.1	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S31	S39	S39
D	1.0	1.0	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40
E	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S25	S25	S33	S33	S41	S41
F	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34	S42	S42
G	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35	S43	S43
H	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36	S44	S44

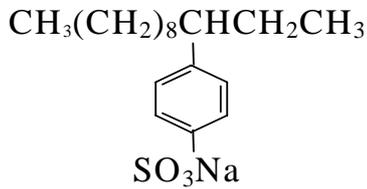
例2)二分割測定: LAS標準液として4系列を使用 (n=2)

一回当たりの検体数が20以下の場合、二分割での測定が可能です (n=2)。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	S5	S5	S13	S13	0	0	S5	S5	S13	S13
B	0.02	0.02	S6	S6	S14	S14	0.02	0.02	S6	S6	S14	S14
C	0.1	0.1	S7	S7	S15	S15	0.1	0.1	S7	S7	S15	S15
D	1.0	1.0	S8	S8	S16	S16	1.0	1.0	S8	S8	S16	S16
E	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S1	S1	S9	S9	S17	S17
F	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S2	S2	S10	S10	S18	S18
G	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S3	S3	S11	S11	S19	S19
H	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S4	S4	S12	S12	S20	S20

## LAS の構造と抗体の交差反応性

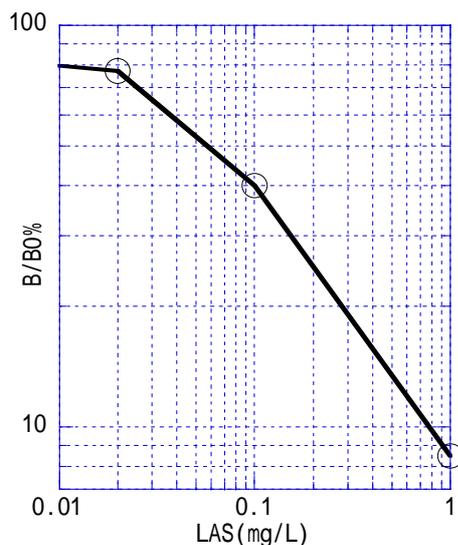
標準品:ドデシルベンゼンスルホン酸



化合物	交差反応性(%)
直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS C12)	100
ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)	1.0
ミリスチン酸ナトリウム(C14)	0.3
ラウリン酸ナトリウム(C12)	0.1
トリパンプレー	0.1
スルホフェニル吉草酸	<0.1
スルホコハク酸ラウリル-2-ナトリウム	<0.1
ベンゼンスルホン酸	<0.1
フェノール	<0.1
トルエン	<0.1
キシレン	<0.1
ノニルフェノールエトキシレート(EO = 10)	<0.1
ポリオキシエチレンソルピタンラウリン酸エステル(EO = 20)	<0.1
パルミチン酸ナトリウム(C16)	<0.1
ステアリン酸ナトリウム(C18)	<0.1

抗 LAS モノクローナル抗体は、他の界面活性剤には交差反応せず、LAS に対する高い特異性を有しています。

## LAS 標準曲線

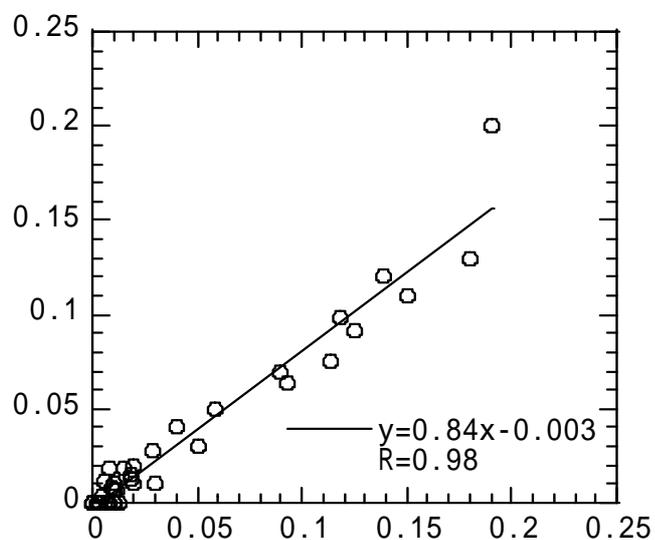


定量範囲は 0.02 ~ 1mg/L と高感度で、定量範囲内濃度の試料はる過だけで測定することができます。

定量下限値以下の試料は、固相抽出による濃縮を併用することで測定可能です。

測定値の CV (変動係数) は 10%以下で、ばらつきが少なく、高精度です。

## HPLC との比較



### 【参考文献】

- 1) 界面活性剤等統計年報 日本界面活性剤工業会 (2001)
- 2) 水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法(平成15年7月22日厚生労働省告示第261号、別表第24)
- 3) 郷田泰弘ら:第48回全国水道研究発表会講演集 (1997)
- 4) Fujita et al, Environ. Sci. Technol. **32** (8), 1143-1146 (1998)
- 5) 小林綾子ら:「界面活性剤用 ELISA の開発」第52回全国水道研究発表会講演集578-579(2001)

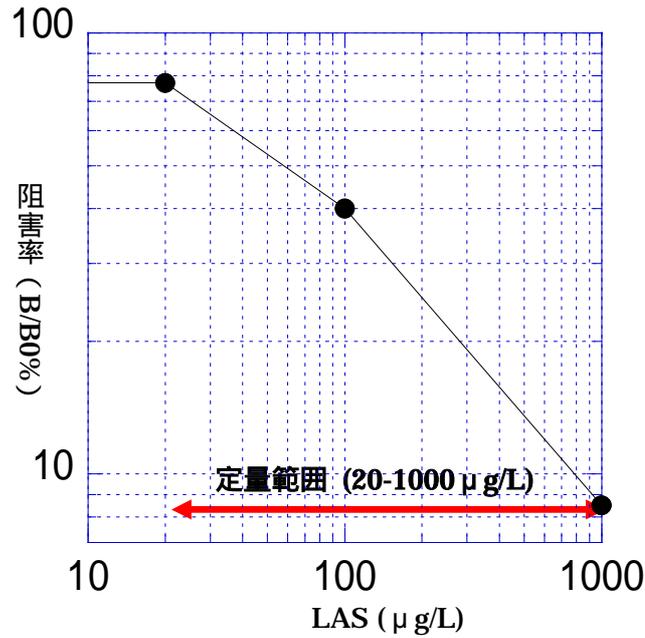
### Memo

- ・本キットは研究用試薬であり、疾病の診断またはその補助として使用することはできません。
- ・使用説明書は予告なく変更する場合があります。
- ・最新の使用説明書は、<http://www.jechem.co.jp/eco> をご参照ください。

## 付録2 自社による性能試験結果

添付資料 LAS-1

### 1- 測定範囲



### 1- 自家管理検体%

前回値	今回値	%
65.9	71.1	108.0
182.2	202.5	111.2

管理検体 sample	吸光度		測定値(μg/L)	
	Low	High	Low	High
1	0.834	0.431	65.7	185.0
2	0.811	0.412	69.1	197.5
3	0.831	0.412	66.1	197.5
4	0.771	0.408	75.5	200.4
5	0.788	0.411	72.7	198.2
6	0.792	0.389	72.0	214.8
7	0.790	0.403	72.4	204.0
8	0.798	0.406	71.1	201.8
9	0.781	0.384	73.8	218.9
10	0.788	0.399	72.7	207.0
AVE	0.798	0.406	71.1	202.5
SD	0.02	0.01	3.2	9.6
CV(%)	2.6	3.2	4.5	4.7

添付資料 LAS-2

1- 繰返し再現性

表1 LAS測定同時再現性

	LAS濃度(ng/ml)					
	0	20	40	80	200	500
1	2	18	43	87	202	578
2	-	23	41	75	205	537
3	-	21	41	85	178	553
4	3	18	37	84	217	537
5	3	26	41	83	204	553
6	-	18	44	65	208	457
7	1	21	45	84	184	501
8	-	22	44	78	199	515
9	-	21	40	78	188	596
10	-	20	39	76	170	541
average	2.5	21.0	41.4	79.5	195.5	536.6
SD	0.8	2.5	2.5	6.4	14.9	39.2
CV (%)	33.7	11.8	6.0	8.1	7.6	7.3

表2 河川水中のLAS測定同時再現性

	単位: ng/ml								
	検体1	検体2	検体3	検体4	検体5	検体6	検体7	検体8	検体9
1	43.6	88.5	241.7	176.6	45.9	34.1	36.4	152.5	93.4
2	44.3	87.5	227.2	185.5	50.0	38.4	38.7	147.5	95.7
3	48.7	85.6	204.4	170.4	50.9	38.2	33.6	129.7	87.8
4	45.4	87.5	227.2	177.7	51.5	40.7	37.4	146.8	91.8
average	45.5	87.3	225.1	177.6	49.6	37.9	36.5	144.1	92.2
SD	2.3	1.2	15.4	6.2	2.5	2.7	2.2	9.9	3.3
CV(%)	5.0	1.4	6.8	3.5	5.1	7.3	5.9	6.9	3.6

1- 日間再現性

表3 河川水中のLAS測定の日差再現性

測定日	単位: ng/ml			
	検体1	検体2	検体3	検体4
970213	10.0	98.0	62.0	11.0
970224	9.0	81.0	56.0	14.0
average	9.5	89.5	59	12.5
SD	0.7	12.0	4.2	2.1
CV(%)	7.4	13.4	7.2	17.0

1- 交差反応性

【LAS 異性体】

LAS異性体との交差反応性	
アルキル鎖長	交差反応性(%)
8	75
9	114
10	101
11	88
12	100
13	45

【洗剤その他】

化合物	交差反応性(%)
直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS C12)	100
ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)	1.0
ミリスチン酸ナトリウム(C14)	0.3
ラウリン酸ナトリウム(C12)	0.1
トリパンプルー	0.1
スルホフェニル吉草酸	<0.1
スルホコハク酸ラウリル-2-ナトリウム	<0.1
ベンゼンスルホン酸	<0.1
フェノール	<0.1
トルエン	<0.1
キシレン	<0.1
ノニルフェノールエトキシレート(EO = 10)	<0.1
ポリオキシエチレンソルビタンラウリン酸エステル(EO = 20)	<0.1
パルミチン酸ナトリウム(C16)	<0.1
ステアリン酸ナトリウム(C18)	<0.1

2- 回収特性

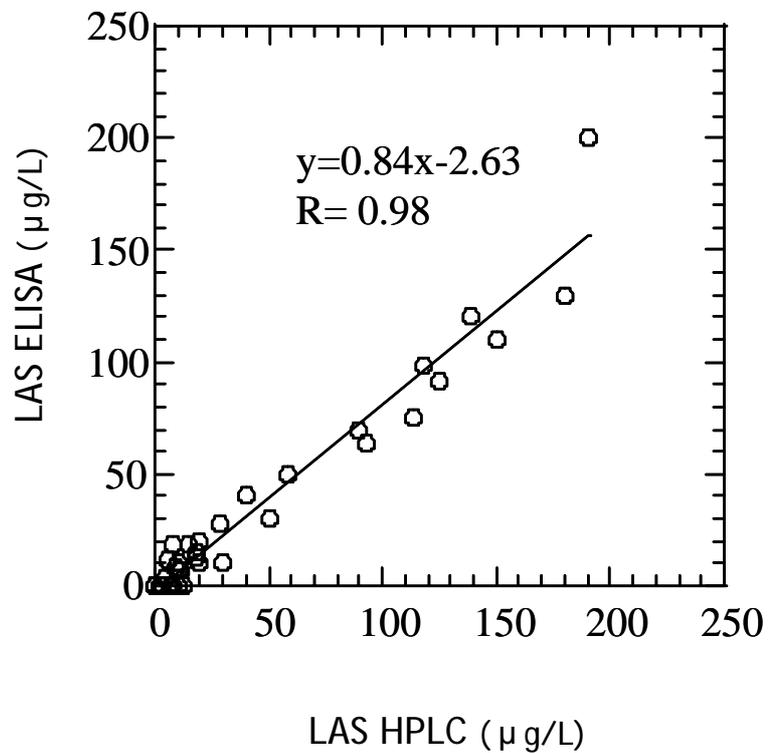
表4 LASの河川水からの添加回収

添加濃度	0 ng/ml	50 ng/ml		100 ng/ml	
	測定値(ng/ml)	測定値(ng/ml)	回収率(%)	測定値(ng/ml)	回収率(%)
検体1	0	46	91	109	109
検体2	0	46	91	93	93
検体3	0	45	89	91	91
検体4	103	155	104	203	100
検体5	0	39	78	88	88
検体6	36	76	80	123	87
検体7	0	39	78	84	84

表5 河川水における添加回収実験

	添加LAS ( $\mu\text{g/l}$ )	回収率 (%)	cv (n=5) (%)
河川 A	50	88	12
河川 B	50	100	14
河川 C	50	84	7
河川 D	50	82	5
河川 A	100	80	8
河川 B	100	94	5
河川 C	100	83	5
河川 D	100	81	5

2- 機器分析との相関



## 付録3 参考となるその他の文書やデータ

### 技術の先進性について

#### 技術の先進性

世界に先駆けて LAS 特異抗体を取得し、ELISA キットの開発に成功、販売を開始した。

#### 特許

「洗剤またはその分解物の免疫学的分析用モノクローナル抗体及びその用途」

日本:特開平 10-155484(1998/6/16)、米国:特許 6251612(2001.6.26)

欧州:特許査定(2004.10.15)、その他:査定中

#### 論文発表

Fujita M. et al; Environ. Sci. Technol. **32** (8), 1143 (1998)

郷田泰弘; 学位論文(2004)

#### 学会発表

郷田ら; 第 48 回全国水道研究発表会講演集 (1997)

小林ら; 「界面活性剤用 ELISA の開発」第 52 回全国水道研究発表会講演集, p578 (2001)

#### 受賞歴

平成 11 年度日本水環境学会・技術賞受賞; 「ELISA 法による陰イオンおよび非イオン界面活性剤の新規測定法」

### その他

- ・ LAS は陰イオン界面活性剤の中で最も生産量が多く、環境調査でも高い頻度で検出されている<sup>1)</sup>。LAS は PRTR の指定化学物質であり、また、水生生物保全に係る環境基準を策定する委員会で<sup>2)</sup>、優先的に検討すべき 81 物質にも選定されており、水環境中の LAS のモニタリングは非常に重要である。
- ・ 陰イオン界面活性剤は水道水質基準で 0.2mg/L 以下に規制されており、平成 16 年の水道法改正により、分析法が陰イオン界面活性剤総量を定量する方法 (MBAS 法) から、LAS を定量する方法 (HPLC 法) に改訂された。河川水を用いた比較では、LAS ELISA キットは機器分析 (HPLC 法) と良好な相関が確認されており<sup>3)</sup>、また、多検体同時分析も可能であることから、LAS を簡便かつ安価にモニタリングするツールとして非常に適した手法であると考えられる。なお、本キットでは、濃縮なしで水道水質基準の 1/10 の濃度まで LAS を定量することが可能である。
- ・ LAS は環境中で SPC (スルフォフェニルカルボン酸) に一度分解され、更に分解が進み浄化されると言われている。SPC を測定できるキットを別途開発しており、LAS ELISA キットとの組み合わせで、LAS の分解過程の把握等が将来可能になるものと考えている。

1) 水質要調査項目測定結果: 検出数 68/76 地点 環境省「要調査項目存在状況調査結果 (平成 12 年度)」

2) 水生生物保全環境基準専門委員会 (環境省中央環境審議会水環境部会)

3) Fujita et al, Environ. Sci. Technol. 1998, 32, 1143-1146