

平成17年度 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 | 株式会社ホリバ・バイオテクノロジー |
| 技術・製品の名称 | 《技術名》 ELISA法（酵素免疫測定法） 《製品名》 ビテルタノール測定キットE |

平成18年3月

鳥 取 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17年5月16日環境省総合環境政策局が策定した実証試験要領第2版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、その結果を取りまとめたものである。

(実証機関)

鳥取県生活環境部衛生環境研究所

所長 杉本雅美

要

約

| | |
|-----------|-----------------------|
| 製品名称 | ビテルタノール測定キットE |
| 環境技術開発者 | 株式会社ホリバ・バイオテクノロジー |
| 実証機関 | 鳥取県 |
| 対象物質 | ビテルタノール |
| 実証試験の実施期間 | 平成17年12月8日～平成18年2月10日 |

1. 実証対象技術の概要

この実証対象製品は、ビテルタノールに対する特異的な抗体を応用した、環境水のビテルタノール測定ELISAキットである。

ELISAの原理は、競合反応（ビテルタノール濃度が高い試料では吸光度が低く、ビテルタノール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 | 内容 |
|--------------|------------------------|
| 製品名 | ビテルタノール測定キットE |
| 型番 | EL106-01 |
| 販売・製造元 | 株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー |
| 重量 (キット一式、g) | 350g |
| 価格 (円) | 99,750 円 |
| 分析対象物質 | ビテルタノール |
| 対象環境媒体 | 水質・底質・生物・その他 () |
| 利用用途 | 環境水その他の水質モニタリング |
| 標準試薬・種類 | 付属 (調製済/調製要) |
| 操作環境 (室温) | 常温 (15°C~25°C) |
| 製品保管条件 | 2°C~8°C |
| 製品保証期間 | 製造後 7 ヶ月間 |
| 同時測定数 (最多) | 46 試料 (n=2 で 1 キット使用時) |
| 測定時間 | 2~3 時間 |

4. 実証試験結果の概要

| 項目 | 結果概要 | |
|-----------------|---|--|
| 実証機関 | 鳥取県 | |
| 製品名称 | ビテルタノール測定キットE | |
| 環境技術開発者 | 株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー | |
| 対象物質 | ビテルタノール | |
| 実証試験計画書の策定 | 平成17年10月 | |
| 実証試験の実施期間 | 平成17年12月8日～平成18年2月10日 | |
| 1) 基本的な性能 | 実験データ | 【参考：製品データ】 |
| ①測定範囲 | 調製濃度9～60 $\mu\text{g/L}$ *1 での 相対値 : 124～127 % 変動係数: 1.4～8.6 % | 9～50 $\mu\text{g/L}$ |
| ②検出下限及び 定量下限 | 調製濃度9 $\mu\text{g/L}$ *1 のSDから求めた 検出下限 (3SD) : 1.1 $\mu\text{g/L}$ 定量下限 (10SD) : 3.7 $\mu\text{g/L}$ 0濃度から求めた検出下限: 8.8 $\mu\text{g/L}$ | 測定下限: 9 $\mu\text{g/L}$ (検出下限、定量下限の記述なし) |
| ③繰返し再現性 | 調製濃度*1 15 $\mu\text{g/L}$ での 変動係数: 3.1 % 標準偏差: 0.610 $\mu\text{g/L}$ | 測定濃度15.10～30.16 $\mu\text{g/L}$ での 標準偏差: 1.93～2.34 $\mu\text{g/L}$ 変動係数: 5.9～9.0% (イチゴ) |
| ④日間再現性 | 調製濃度*1 9～60 $\mu\text{g/L}$ での 変動係数: 1.1～4.4 % 標準偏差: 0.314～1.659 $\mu\text{g/L}$ | 測定濃度15.10～30.16 $\mu\text{g/L}$ での 標準偏差: 1.12～2.90 $\mu\text{g/L}$ 変動係数: 3.8～15.5% (イチゴ) |
| ⑤期間再現性 | 調製濃度*1 9～60 $\mu\text{g/L}$ で1ヶ月を隔てて2回測定した時の 変動係数: 0ヶ月 : 2.3～4.1 % 1ヶ月後: 0.9～4.7 % | 保存安定性 7ヶ月 |
| ⑥プレート間再現性 | 調製濃度*1 9～60 $\mu\text{g/L}$ での変動係数: 4.2～10.7 % (同一プレート2枚、異プレート1枚間) | — |
| ⑦交差反応性 | 交差率: トリアジメノール (和光純薬工業製 異性体 A 19.5 % B 80.5 %) : 136 % トリアジメノール (Dr. Ehrenstorfer 製 異性体 A 82.7 % B 17.3 %) : 28.8 % トリアジメノール (Riedel-de Haen 製 異性体 A 99.0 % B 1.0 %) : 2.6 % トリアジメノール : <0.1 % | 交差率: トリアジメノール 13.9% トリアジメノール <0.1% |
| ⑧その他 | ビテルタノール (Riedel-de Haen 製 異性体 A 99.0 % B 1.0%) 調製濃度9～60 $\mu\text{g/L}$ での 相対値 : 26～49 % 変動係数: 1.2～6.8 % | — |

| 2) 実用的な性能 | 実験データ | 【参考：製品データ】 |
|-----------|--|--------------------|
| ①回収特性 | ビテルタノール*1 を添加 (15 μg/L) した河川水に、フミン酸トリウムを添加 (0, 1, 5, 10, 50mg/L) した試料の回収率： 120～139 % | 112.3～129.3% (イチゴ) |
| ②測定精度等 | ビテルタノール*1 (15 μg/L) 添加試験 ELISA 法 回収率 : 116 ~ 119 % 変動係数 : 2.3 ~ 6.4 % GC/MS 法 回収率 : 87 ~ 90 % 変動係数 : 3.0 ~ 5.0 % | — |

(1) 製品性能の信頼性

実証試験で実施した基本性能6項目(測定範囲、繰り返し再現性、日間再現性、期間再現性、プレート間再現性)において、測定濃度範囲(9~60 μg/L)では妥当な結果が得られた。

ビテルタノール異性体 B ((1R, 2R) 及び (1S, 2S) の混合物) の含有率が低い市販標準品を用いて測定したところ、相対回収率が 26~49%と低い値を示したことから、このキットに使用されている抗体は、異性体 B に強く反応していることが確認された。したがって、このキットは異性体 B を測定するキットであり、異性体 A ((1R, 2S) 及び (1S, 2R) の混合物) にも弱い交差反応性を示すものであるといえる。

交差反応性では、トリアジメノール標準品の異性体組成比の違いにより 2.6~136%の交差率を示した。

(2) 一般環境モニタリングでの実用性

本試験の検討範囲においては、試料マトリックスによる影響は軽微であり、測定精度も妥当であった。

現在、上市されているビテルタノール農薬製剤は、異性体 B が 20~30%含有されており、異性体 A、B は毒性及び環境中での分解性も類似した挙動を示すことがわかっている。したがって、このキットによりビテルタノール異性体 B の環境中の汚染状況を把握することは可能であると考えられた。

(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、試料の前処理がない場合、約 3 時間で測定結果が得られ、同時に約 26 試料 (3 重測定) の測定が可能であり、本試験での GC/MS-SIM 法では、3 試料 (3 重測定) の測定に約 3 日が必要であることから操作の簡便性は高いといえる。

また、製品に添付された取扱説明書は、試験操作についての記述は妥当であるが、ビテルタノール及びトリアジメノールの異性体の違いによる反応性の違いについての記載がないため使用に当たっては留意する必要がある。

*1 本試験において、ビテルタノール市販標準品は和光純薬工業製 (異性体 A : **85.3** % B : **14.7** %) を使用した。

*2 本試験に使用したビテルタノール及びトリアジメノール市販標準品の異性体比は GC/MS により測定した値である。

本

編

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 | 3 |
| 2.1 実証申請者 | 3 |
| 2.2 実証対象技術の原理 | 3 |
| 2.3 実証対象製品のデータ（性能、製品製造者、製品番号等） | 3 |
| 3. 実証試験実施体制 | 4 |
| 3.1 実証試験申請者 | 4 |
| 3.2 実証試験実施者 | 4 |
| 3.3 実証試験実施場所 | 5 |
| (1) E L I S A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 | 5 |
| 4.1 共通して行う試験操作 | 5 |
| (1) 製品の操作 | 5 |
| (2) 検量線作成用標準溶液の調製 | 5 |
| (3) 吸光度の測定 | 5 |
| (4) 検量線の作成 | 5 |
| (5) 実測濃度の算出 | 5 |
| 4.2 基本的な性能 | 6 |
| (1) 測定範囲 | 6 |
| (2) 検出下限及び定量下限 | 7 |
| (3) 繰返し再現性 | 8 |
| (4) 日間再現性 | 9 |
| (5) 期間再現性 | 10 |
| (6) プレート間再現性 | 11 |
| (7) 交差反応性 | 12 |

| | |
|--------------------|----|
| 4.3 実用的な性能 | 13 |
| (1)回収特性 | 13 |
| (2)測定精度等 | 14 |
| 5. 試験結果 | 15 |
| 5.1 基本的な性能 | 15 |
| (1)測定範囲 | 15 |
| (2)検出下限及び定量下限 | 16 |
| (3)繰返し再現性 | 18 |
| (4)日間再現性 | 19 |
| (5)期間再現性 | 22 |
| (6)プレート間再現性 | 24 |
| (7)交差反応性 | 26 |
| (8)その他 | 30 |
| 5.2 実用的な性能 | 32 |
| (1)回収特性 | 32 |
| (2)測定精度等 | 33 |
| 6 実証試験結果の検討と考察 | 36 |
| (1)製品性能の信頼性 | 36 |
| (2)一般環境モニタリングでの実用性 | 36 |
| (3)製品操作等の簡便性 | 36 |

付録：ビテルタノール物性表

付録：実証試験計画書

1. 実証試験の概要

1.1 実証対象製品のデータ

実証試験実施者並びに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 1.1.1 実証対象製品のデータ

| 項目 | 内容 |
|-------------|---|
| 技術製品の名称 | ビテルタノール測定キットE |
| 実証申請者 | 株式会社ホリバ・バイオテクノロジー 代表取締役社長 河野 猛 |
| 実証試験実施者 | 鳥取県生活環境部衛生環境研究所 所長 杉本 雅美 |
| 実証試験実施場所 | 〒682-0704 鳥取県東伯郡湯梨浜町南谷 526-1 鳥取県生活環境部衛生環境研究所 |
| 実証試験実施期間 | 平成 17 年 12 月 8 日～平成 18 年 2 月 10 日 |
| 製品名 | ビテルタノール測定キットE |
| 型番 | EL106-01 |
| 販売・製造元 | 株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー |
| 重量（キット一式、g） | 350g |
| 価格（円） | 99,750 円 |
| 分析対象物質 | ビテルタノール |
| 対象環境媒体 | 水質・底質・生物・その他（ ） |
| 利用用途 | 環境水その他の水質モニタリング |
| 標準試薬・種類 | 付属（調製済）/調製要 |
| 操作環境（室温） | 常温（15℃～25℃） |
| 製品保管条件 | 2℃～8℃ |
| 製品保証期間 | 製造後 7 ヶ月間 |
| 同時測定数（最多） | 46 試料（n=2 で 1 キット使用時） |
| 測定時間 | 2～3 時間 |

1.2 実証試験結果

(1) 基本的な性能

測定範囲

製品の測定範囲に調製した試験用試料溶液（9, 15, 30, 60 $\mu\text{g/L}$ ）を測定した実測値の相対値は124~127%、変動係数は1.4~8.6%であった。

（製品のデータ：B/B0 0.8~0.2 付近の濃度として9~50ppb）

検出下限及び定量下限

製品の測定範囲の下限付近（9 $\mu\text{g/L}$ ）に調製した試験用試料溶液を繰返し（n=8）測定した実測値の標準偏差（SD）から求めた検出下限（3SD）は、1.1 $\mu\text{g/L}$ 、定量下限（10SD）は、3.7 $\mu\text{g/L}$ であった。また、指定濃度系列0濃度の吸光度を10回測定し、その標準偏差（SD）から得られる3SD値（吸光度）を0濃度の吸光度から差し引いた吸光度より、検量線を用いて求めた検出下限²は、8.8 $\mu\text{g/L}$ であった。

（製品のデータ：測定範囲の下限値 9 $\mu\text{g/L}$ ）

繰返し再現性

製品の測定範囲の中央付近（15 $\mu\text{g/L}$ ）に調製した試験用試料溶液を繰返し（3重測定で8回測定）測定した実測値の変動係数は、3.1%（標準偏差0.610 $\mu\text{g/L}$ 、n=8）であった。

（製品のデータ：同時再現性（n=8）として標準偏差：1.93~2.34、変動係数5.9~9.0%（いちご））

日間再現性

製品の測定範囲（9~60 $\mu\text{g/L}$ ）に調製した試験用試料溶液を、3日間（1週間以内）測定した実測値（3重測定の平均値）の変動係数は、1.1~4.4%であった。

（製品のデータ：3日間で標準偏差：1.12~2.90、変動係数3.8~15.5%（いちご））

期間再現性

製品の測定範囲（9~60 $\mu\text{g/L}$ ）に調製した試験用試料溶液を、同一ロットの2プレートを用意し、1ヶ月の期間を隔てて2回測定した。各試料溶液について3重測定を行った各OD値をそれぞれ濃度に換算した値の変動係数は、0ヶ月では2.3~4.1%、1ヶ月後では、0.9~4.7%であった。

（製品のデータ：保存安定性試験で7ヶ月は安定）

プレート間再現性

製品の測定範囲（9~60 $\mu\text{g/L}$ ）に調製した試験用試料溶液を、同一ロットの2プレート（A,C）と、異なるロットの1プレート（B）を同日に測定した実測値（3重測定の平均値）の変動係数は、4.2~10.7%であった。

（製品のデータ：なし）

交差反応性

交差反応率は、トリアジメノール（和光純薬工業製 異性体 A19.5% B80.5%）136%、トリアジメノール（Dr. Ehrenstorfer 製 異性体 A82.7% B17.3%）28.8%、トリアジメノール（Riedel-de Haen 製 異性体 A99.0% B1.0%）2.6%、トリアジメホン<0.1%であった。

（製品のデータ：トリアジメノール13.9%、トリアジメホン<0.1%）

その他

ビテルタノール市販標準品 (Riedel-de Haen 社製 異性体A ((1R, 2S) 及び (1S, 2R) の混合物 98.1%、B (1R, 2R) 及び (1S, 2S) の混合物) 1.9%) を用いて製品の測定範囲に調製した試験用試料溶液 (9, 15, 30, 60 $\mu\text{g/L}$) を測定した実測値の相対値は 26~49%、変動係数は 1.2~6.8 %であった。

(2) 実用的な性能

回収特性

河川水ろ過水に測定範囲の中央付近 (15 $\mu\text{g/L}$) にビテルタノールを添加し、更にフミン酸ナトリウムを添加 (1~50mg/L) した時のビテルタノールの回収率は、120~139%であった。

(製品のデータ：添加回収率112.3~129.3% (いちご))

測定精度等

河川水ろ過水 (3 地点) をそれぞれ 3 回測定したところ、ビテルタノールの測定値は ELISA 法、GC/MS 法のいずれも検出下限未満 (ELISA 検出下限 1 1.1 $\mu\text{g/L}$ 検出下限 2 8.8 $\mu\text{g/L}$ GC/MS 検出下限 0.02 $\mu\text{g/L}$) であった。

また、河川水ろ過水 (3 地点) にビテルタノール標準品を添加し、ビテルタノール濃度を 15 $\mu\text{g/L}$ とした試料を測定したところ、ELISA 法では、変動係数 2.3~6.4%、回収率 116~119% であり、GC/MS 法では、変動係数 3.0~5.0%、回収率 87~90% であった。

(製品のデータ：なし)

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：株式会社ホリバ・バイオテクノロジー
代 表 者：代表取締役社長 河野 猛
担当者所属・氏名：試薬事業部開発・製造部 伊東茂壽
住 所：〒601-8315 京都府京都市南区吉祥院車道町 4 8 番地
電 話 番 号：075-692-1786
F A X 番 号：075-692-1790
e-mail アドレス：Shigekazu.ito@horiba.com

2.2 実証対象技術の原理

本実証対象製品は、ビテルタノールに対する特異的な抗体を応用した、環境水のビテルタノール測定 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 2.3 に示すとおりである。

表2.3 製品データ

| 項目 | 内容 |
|--------------|------------------------|
| 製品名 | ビテルタノール測定キット E |
| 型番 | EL106-01 |
| 販売・製造元 | 株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー |
| 重量 (キット一式、g) | 350g |
| 価格 (円) | 99,750 円 |
| 分析対象物質 | ビテルタノール |
| 対象環境媒体 | 水質・底質・生物・その他 () |
| 利用用途 | 環境水その他の水質モニタリング |
| 標準試薬・種類 | 付属 (調製済/調製要) |
| 操作環境 (室温) | 常温 (15℃~25℃) |
| 製品保管条件 | 2℃~8℃ |
| 製品保証期間 | 製造後 7 ヶ月間 |
| 同時測定数 (最多) | 46 試料 (n=2 で 1 キット使用時) |
| 測定時間 | 2~3 時間 |

3. 実証試験実施体制

3.1 実証試験申請者

実施責任者：鳥取県生活環境部環境政策課長 野間田 憲昭
 所属部署：生活環境部環境政策課環境立県戦略担当
 担当者氏名：衛生技師 梁川直宏
 住所：〒680-0011 鳥取県鳥取市東町1丁目220番地
 電話番号：0857-26-7876
 FAX番号：0857-22-4240
 e-mail アドレス：yanagawan@pref.tottori.jp

3.2 実証試験実施者

実施責任者：鳥取県生活環境部衛生環境研究所 所長 杉本雅美
 実証試験担当者氏名：(ELISA法) 保健衛生室 研究員 金田聡子
 (機器分析法) 食品衛生室 研究員 山根一城
 連絡窓口：食品衛生室 研究員 山根一城
 住所：〒682-0704 鳥取県東伯郡湯梨浜町南谷526-1
 電話番号：0858-35-5421
 FAX番号：0858-35-5413
 e-mail アドレス：yamane-ka@pref.tottori.jp

3.3 実証試験実施場所

(1) ELISA法

鳥取県生活環境部衛生環境研究所保健衛生室

(2) 機器分析法

鳥取県生活環境部衛生環境研究所食品衛生室

3.4 実証試験実施期間

平成17年12月8日～平成18年2月10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」及び「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、品質管理マニュアルに規定したELISA法試験標準作業書に従って行った。

(2) 検量線作成用標準溶液の調製

キットに付属するビテルタノール標準試薬を用い、製品の取扱説明書に記載の方法により、指定濃度系列を調製した。

(3) 吸光度の測定

吸光度は、マイクロプレートリーダー（TECAN 社製スペクトラサーモ）で測定し、検量線作成用標準溶液及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測定したゼロブランク（添付の希釈液等）及び検量線作成用標準溶液の吸光度（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：和光純薬工業（株）製LS-PLATEmanager 2001）

(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 | ビテルタノール |
| 対象製品名 | ビテルタノール測定キット E |
| 製品番号 | ロット番号 E-BTN 001F |
| 製造年月日 | 平成 17 年 9 月 29 日 |
| 測定範囲（製品仕様） | 9 ～ 50 μ g/L |
| 試験日時 | 平成 17 年 12 月 08 日 15:40 ～ 19:00 |
| 試験場所 | 鳥取県生活環境部衛生環境研究所 第 5 微生物室 |
| 試験時室内温度 | 20 \pm 1 $^{\circ}$ C |
| 使用した市販標準品 | 物質名 : ビテルタノール 試薬会社名 : 和光純薬工業(株) 製品番号 : 024-10233 ロット番号 : RWG9953 |
| 検量線用ソフト名 | LS-PLATE manager 2001（和光純薬工業（株）製） |
| 試験機関担当者 | 鳥取県生活環境部衛生環境研究所 保健衛生室 研究員 金田聡子 |

試験操作

ビテルタノールを用いて、10%メタノール溶液を希釈溶媒として、試験用試料溶液（0, 9, 15, 30, 60 μ g/L）を調製した。調整した試験用試料溶液を用いて、各調整濃度につき 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、標準偏差、変動係数を求めた。

(2) 検出下限及び定量下限

試験条件

本製品の検出下限及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 検出下限及び定量下限の試験条件

| 項目 | 内容 |
|------------|---|
| 実証項目 | 基本的な性能・検出下限及び定量下限（標準試料試験） |
| 対象物質 | ビテルタノール |
| 対象製品名 | ビテルタノール測定キット E |
| 製品番号 | ロット番号 E-BTN 001F |
| 製造年月日 | 平成 17 年 9 月 29 日 |
| 測定範囲（製品仕様） | 9 ～ 50 $\mu\text{g/L}$ |
| 試験日時 | 平成 17 年 12 月 13 日 10:00 ～ 15:00 |
| 試験場所 | 鳥取県生活環境部衛生環境研究所 第 5 微生物室 |
| 試験時室内温度 | 20 $^{\circ}\text{C}$ |
| 使用した市販標準品 | 物質名 : ビテルタノール 試薬会社名 : 和光純薬工業(株) 製品番号 : 024-10233 ロット番号 : RWG9953 |
| 検量線用ソフト名 | LS-PLATEmanager 2001 (和光純薬工業 (株) 製) |
| 試験機関担当者 | 鳥取県生活環境部衛生環境研究所 保健衛生室 研究員 金田聡子 |

試験操作

検出下限1

ビテルタノールを用いて、10%メタノール溶液を希釈溶媒として、試験用試料溶液（9 $\mu\text{g/L}$: 測定範囲の下限付近濃度）を調製した。調製した試験用試料溶液を 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) を求めた。この値から得られた 3SD および 10SD をそれぞれ検出下限および定量下限とした。

検出下限 2

指定濃度系列 0 濃度の吸光度を 3 重測定で 10 回測定し、その標準偏差 (SD) から得られた 3SD 値 (吸光度) を 0 濃度の平均吸光度から差し引いた吸光度から求めた濃度を検出下限とした。

(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 | ビテルタノール |
| 対象製品名 | ビテルタノール測定キット E |
| 製品番号 | ロット番号 E-BTN 001F |
| 製造年月日 | 平成 17 年 9 月 29 日 |
| 測定範囲（製品仕様） | 9 ～ 50 $\mu\text{g/L}$ |
| 試験日時 | 平成 17 年 12 月 13 日 10:00 ～ 15:00 |
| 試験場所 | 鳥取県生活環境部衛生環境研究所 第 5 微生物室 |
| 試験時室内温度 | 20 $^{\circ}\text{C}$ |
| 使用した市販標準品 | 物質名 : ビテルタノール 試薬会社名 : 和光純薬工業(株) 製品番号 : 024-10233 ロット番号 : RWG9953 |
| 検量線用ソフト名 | LS-PLATE manager 2001 (和光純薬工業 (株) 製) |
| 試験機関担当者 | 鳥取県生活環境部衛生環境研究所 保健衛生室 研究員 金田聡子 |

試験操作

ビテルタノールを用い、10%メタノール溶液を希釈溶媒として、試験用試料溶液(15 $\mu\text{g/L}$: 測定範囲の直線付近濃度)を調製した。調製した試験用試料溶液を3重測定で8回測定し、得られた8個の実測濃度より平均値、標準偏差、変動係数を求めた。求めた変動係数から、繰返し再現性について検討した。

(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 | ビテルタノール |
| 対象製品名 | ビテルタノール測定キット E |
| 製品番号 | ロット番号：E-BTN 001F |
| 製造年月日 | 平成 17 年 9 月 29 日 |
| 測定範囲（製品仕様） | 9 ～ 50 μ g/L |
| 試験日時 | 平成 17 年 12 月 8 日 10:00 ～ 13:15 平成 17 年 12 月 10 日 9:20 ～ 13:20 平成 17 年 12 月 12 日 10:00 ～ 17:00 |
| 試験場所 | 鳥取県生活環境部衛生環境研究所 第 5 微生物室 |
| 試験時室内温度 | 12 月 8 日 20 \pm 1 $^{\circ}$ C 12 月 10 日 20 $^{\circ}$ C 12 月 12 日 21 $^{\circ}$ C |
| 使用した市販標準品 | 物質名：ビテルタノール 試薬会社名：和光純薬工業(株) 製品番号：024-10233 ロット番号：RWG9953 |
| 検量線用ソフト名 | LS-PLATEmanager 2001（和光純薬工業（株）製） |
| 試験機関担当者 | 鳥取県生活環境部衛生環境研究所 保健衛生室 研究員 金田聡子 |

試験操作

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、「(1) 測定範囲」と同じ測定操作を行った。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、3 日間の比較から日間再現性について検討した。

(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 | ビテルタノール |
| 対象製品名 | ビテルタノール測定キット E |
| 製品番号 | ロット番号 E-BTN 001F |
| 製造年月日 | 平成 17 年 9 月 29 日 |
| 測定範囲（製品仕様） | 9 ～ 50 μ g/L |
| 試験日時 | 平成 17 年 12 月 14 日 9:00 ～ 12:00 平成 18 年 1 月 17 日 13:30 ～ 15:45 |
| 試験場所 | 鳥取県生活環境部衛生環境研究所 第 5 微生物室 |
| 試験時室内温度 | 12 月 14 日 21 $^{\circ}$ C 1 月 17 日 21 $^{\circ}$ C |
| 使用した市販標準品 | 物質名 : ビテルタノール 試薬会社名 : 和光純薬工業(株) 製品番号 : 024-10233 ロット番号 : RWG9953 |
| 検量線用ソフト名 | LS-PLATEmanager 2001 (和光純薬工業 (株) 製) |
| 試験機関担当者 | 鳥取県生活環境部衛生環境研究所 保健衛生室 研究員 金田聡子 |

試験操作

同一ロットの 2 プレートを用意し、1 プレートで「(1) 測定範囲」と同じ検討を行った後、冷蔵等指定の方法で保存した 1 プレートで概ね 1 ヶ月後に同じ操作を行った。各測定結果 (OD 値) からの換算値 (濃度) の変動係数を求め、期間を隔てての再現性について検討した。

(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 | ビテルタノール |
| 対象製品名 | ビテルタノール測定キット E |
| 製品番号 | ロット番号 E-BTN 001F、E-BTN 002F |
| 製造年月日 | E-BTN 001F 平成 17 年 9 月 29 日 E-BTN 002F 平成 17 年 10 月 18 日 |
| 測定範囲（製品仕様） | 9 ～ 50 μ g/L |
| 試験日時 | 平成 17 年 12 月 14 日 9:00 ～ 15:00 |
| 試験場所 | 鳥取県生活環境部衛生環境研究所 第 5 微生物室 |
| 試験時室内温度 | 21 $^{\circ}$ C |
| 使用した市販標準品 | 物質名 : ビテルタノール 試薬会社名 : 和光純薬工業(株) 製品番号 : 024-10233 ロット番号 : RWG9953 |
| 検量線用ソフト名 | LS-PLATE manager 2001（和光純薬工業（株）製） |
| 試験機関担当者 | 鳥取県生活環境部衛生環境研究所 保健衛生室 研究員 金田聡子 |

プレート間再現性

同一ロット 2 プレート及び異なるロット 1 プレートの 3 プレートを用いて、同日に「(1) 測定範囲」と同じ測定操作を行った。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、同一ロット及び異なるロットの比較からプレート間再現性について検討した。

(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 | ビテルタノール |
| 対象製品名 | ビテルタノール測定キット E |
| 製品番号 | ロット番号：E-BTN 001F |
| 製造年月日 | 平成 17 年 9 月 29 日 |
| 測定範囲（製品仕様） | 9 ～ 50 μ g/L |
| 試験日時 | 平成 18 年 2 月 6 日 12:30 ～ 15:30 平成 18 年 2 月 10 日 10:20 ～ 13:30 |
| 試験場所 | 鳥取県生活環境部衛生環境研究所 第 5 微生物室 |
| 試験時室内温度 | 2 月 6 日 21 $^{\circ}$ C 2 月 10 日 21 $^{\circ}$ C |
| 検量線用ソフト名 | LS-PLATE manager 2001（和光純薬工業（株）製） |
| 試験機関担当者 | 鳥取県生活環境部衛生環境研究所 保健衛生室 研究員 金田聡子 |

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 | ビテルタノール | 和光純薬工業（株） | 残留農薬試験用 | 99.0% | 024-10233 | RWG9953 |
| | | Riedel-de Haen | Mixture of diastereomers | 98.7% | 45349 | 2522X |
| 類似物質 | トリアジメノール | 和光純薬工業（株） | 残留農薬試験用 | 99.0% | 208-08503 | HSP9170 |
| | | Riedel-de Haen | IsomerA | 98.0% | 45694 | 21260 |
| | | Dr. Ehrenstorfer GmbH | isomer A+B | 97.9% | C17620000 | 30514 |
| | トリアジメホン | 和光純薬工業（株） | 残留農薬試験用 | 99.0% | 205-08493 | HSP9153 |

表4.2.9 試験用試料溶液

| 試験項目 | 物質名 | 試料溶液調製濃度 |
|--------|-------------------------------------|------------------------------|
| ⑦交差反応性 | トリアジメノール(和光純薬工業（株）) | 1, 10, 20, 50, 100 μ g/L |
| | トリアジメホン | 10, 20, 50, 100 mg/L |
| | トリアジメノール (Riedel-de Haen) *1 | 1, 10, 100, 1000 μ g/L |
| | トリアジメノール (Dr. Ehrenstorfer GmbH) *1 | 1, 10, 100, 1000 μ g/L |

* 1 平成 18 年 2 月 10 日に試験実施

試験操作

ビテルタノール及び類似物質について調製した試料溶液で吸光度曲線（実測値は 3 重測定の平均値から求めた）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た。（ビテルタノールの 50% 発色阻害濃度/類似物質の 50% 発色阻害濃度） \times 100（%）で交差率を求めた。類似物質を調節した濃度範囲内で 50% 発色阻害濃度が求められなかった場合には、より低い発色阻害濃度から交差率を求めた。

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 | ビテルタノール |
| 対象製品名 | ビテルタノール測定キット E |
| 製品番号 | ロット番号 E-BTN 001F |
| 製造年月日 | 平成 17 年 9 月 29 日 |
| 測定範囲（製品仕様） | 9 ～ 50 $\mu\text{g/L}$ |
| 試験日時 | 平成 18 年 1 月 20 日 16:45 ～ 19:30 |
| 試験場所 | 鳥取県生活環境部衛生環境研究所 第 5 微生物室 |
| 試験時室内温度 | 21 $^{\circ}\text{C}$ |
| 使用した市販標準品 | 物質名 : ビテルタノール 試薬会社名 : 和光純薬工業 (株) 製品番号 : 024-10233 ロット番号 : RWG9953 |
| 使用した市販標準品 | 物質名 : フミン酸ナトリウム 試薬会社名 : アクロス 製品番号 : 120860050 ロット番号 : A0207160001 |
| 検量線用ソフト名 | LS-PLATE manager 2001 (和光純薬工業 (株) 製) |
| 試験機関担当者 | 鳥取県生活環境部衛生環境研究所 保健衛生室 研究員 金田聡子 |

表 4.3.2 使用した河川水

| 試料番号 | 地点名 | 採水日 | 採水量 | 備考 |
|------|-----------|------------------|-----|--------------------|
| S1 | 福光橋 (国府川) | 平成 18 年 1 月 18 日 | 9L | pH 7.5 COD 3.5mg/L |

試験操作

グラスファイバーフィルター（GFC：孔径 1.2 μm ）を用いて、河川水をろ過したろ液を原水とし、それに測定範囲の中央付近となるようにビテルタノールを添加（15 $\mu\text{g/L}$ ）するとともに、環境試料を想定した妨害物質としてフミン酸ナトリウムを添加（0, 1, 5, 10, 50 mg/L ）して、試験用試料溶液を調製した。なお、フミン酸ナトリウムは、含量 50～60%の表示であったことから、平均含量 55%として試料の調製を行った。調製した試験用試料溶液について、3 重測定した実測濃度から回収率を求め、フミン酸ナトリウムに対する製品の回収特性を検討した。

(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 4.3.3 測定精度の試験条件

| 項目 | 内容 |
|------------|--|
| 実証項目 | 実用的な性能・測定精度（模擬環境試料試験） |
| 対象物質 | ビテルタノール |
| 対象製品名 | ビテルタノール測定キット E |
| 製品番号 | ロット番号 E-BTN 001F |
| 製造年月日 | 平成 17 年 9 月 29 日 |
| 測定範囲（製品仕様） | 9 ～ 50 μ g/L |
| 試験日時 | 平成 18 年 1 月 23 日 10:30 ～ 13:30 平成 18 年 1 月 27 日 14:00 ～ 16:15 |
| 試験場所 | 鳥取県生活環境部衛生環境研究所 第 5 微生物室 |
| 試験時室内温度 | 1 月 23 日 21 $^{\circ}$ C 1 月 27 日 21 $^{\circ}$ C |
| 検量線用ソフト名 | LS-PLATE manager 2001（和光純薬工業（株）製） |
| 試験機関担当者 | 鳥取県生活環境部衛生環境研究所 保健衛生室 研究員 金田聡子 |

表 4.3.4 使用した環境試料

| 試料番号 | 地点名 | 採水日 | 採水量 | 備考 |
|------|----------|------------------|-----|---------------------|
| S1 | 福光橋（国府川） | 平成 18 年 1 月 18 日 | 9L | pH 7.5 COD 3.5mgO/L |
| S2 | 宮川町（玉川） | 平成 18 年 1 月 18 日 | 9L | pH 7.0 COD 1.4mgO/L |
| S3 | 堺町（鉢屋川） | 平成 18 年 1 月 18 日 | 9L | pH 7.5 COD 4.1mgO/L |

試験操作

複数の河川地点から得られた河川水のろ過原水について、キットが指定または推奨する前処理法で処理し、対象物質を測定する。前処理法が指定または推奨されていない場合には、原水をそのまま測定し、同一試料について、所定の分析方法に従って機器分析を行なった。

また、原水に適当な低濃度でビテルタノールを添加し、添加試料水について ELISA キットの測定（前処理・濃縮を含む）および機器分析をおこなった。

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 | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 9 | 15 | 30 | 60 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | — | 1.235 | 0.934 | 0.731 | 0.422 | 0.190 |
| | 2 | — | 1.178 | 0.886 | 0.683 | 0.397 | 0.182 |
| | 3 | — | 1.114 | 0.853 | 0.669 | 0.383 | 0.178 |

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 ² |
|--------|-------|-------|-------|---------|----------------|
| 値 | 1.178 | 1.476 | 19.19 | -0.0009 | 0.993 |

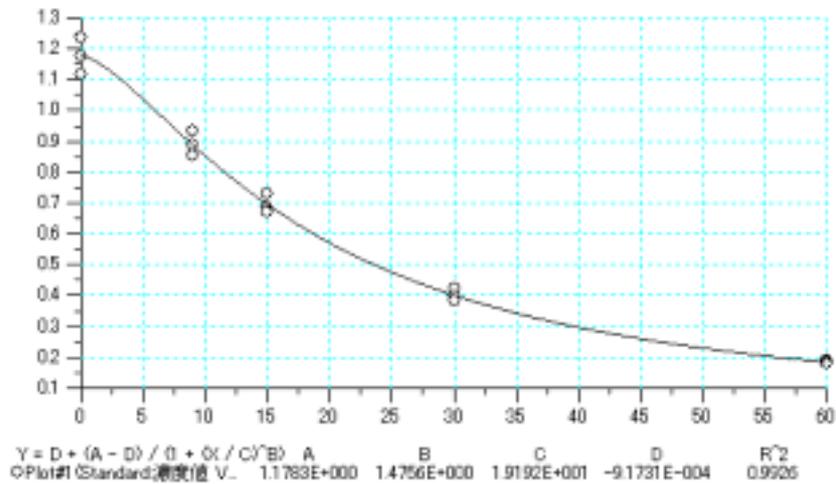


図 5.1.1 検量線

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 | 0 | 9 | 15 | 30 | 60 | | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | | |
| ELISA 実測 | 吸光度 | 1 | — | 1.118 | 0.840 | 0.640 | 0.333 | 0.140 |
| | | 2 | — | 1.086 | 0.776 | 0.582 | 0.312 | 0.137 |
| | | 3 | — | 1.100 | 0.813 | 0.581 | 0.299 | 0.142 |
| | | 平均 | — | 1.101 | 0.810 | 0.601 | 0.315 | 0.140 |
| | 換算値 | μg/L | — | 11.3 | 18.7 | 38.0 | 74.3 | |
| 標準偏差 | μg/L | — | 0.970 | 1.420 | 1.893 | 1.024 | | |
| 変動係数 | % | — | 8.6 | 7.6 | 5.0 | 1.4 | | |
| 相対値** | % | — | 125 | 125 | 127 | 124 | | |

** 調整濃度を 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) 検出下限及び定量下限

検量線の作成

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 | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 9 | 15 | 30 | 60 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | — | 1.224 | 0.968 | 0.745 | 0.404 | 0.190 |
| | 2 | — | 1.205 | 0.900 | 0.686 | 0.357 | 0.184 |
| | 3 | — | 1.158 | 0.844 | 0.660 | 0.360 | 0.176 |

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 ² |
|--------|-------|-------|-------|-------|----------------|
| 値 | 1.196 | 1.560 | 17.72 | 0.033 | 0.992 |

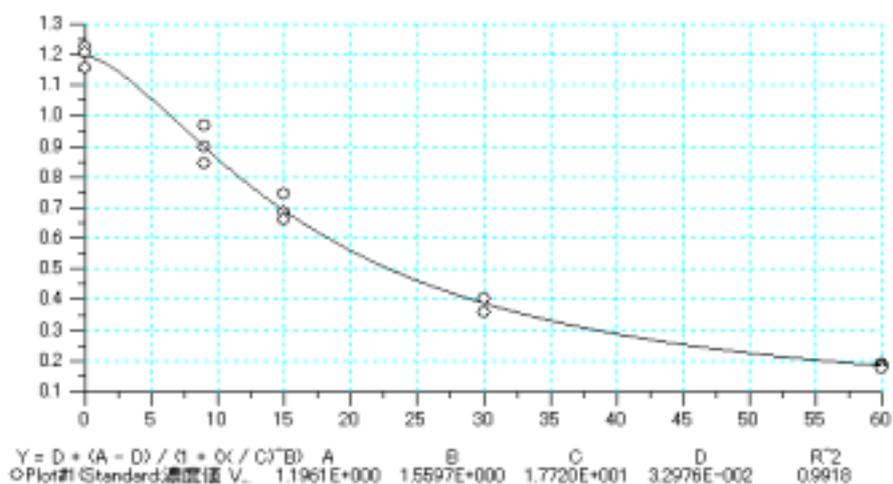


図 5.1.2 検量線

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 5.1.6.1 対象物質試料溶液の測定データ（検出下限 1）

| 項目 | 単位 | 試験用試料溶液 | | | | | | | | | |
|-------------|------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 溶液S1 | | | | | | | | | |
| 調製濃度 | μg/L | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | |
| 実測回数 | 回 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | | |
| ELISA 実測 | 吸光度 | 1 | — | 0.812 | 0.774 | 0.763 | 0.764 | 0.761 | 0.794 | 0.794 | 0.788 |
| | | 2 | — | 0.780 | 0.776 | 0.757 | 0.762 | 0.749 | 0.747 | 0.766 | 0.797 |
| | | 3 | — | 0.758 | 0.749 | 0.757 | 0.750 | 0.743 | 0.751 | 0.756 | 0.778 |
| | 平均 | — | 0.783 | 0.766 | 0.759 | 0.759 | 0.751 | 0.764 | 0.772 | 0.788 | |
| | 換算値 | μg/L | 12.1 | 12.6 | 12.8 | 12.8 | 13.0 | 12.7 | 12.4 | 12.0 | |
| 標準偏差 | μg/L | 0.372 | | | | | | | | | |

検出下限 (3SD) = 1.1 μg/L 定量下限 (10SD) = 3.7 μg/L

表 5.1.6.2 対象物質試料溶液の測定データ（検出下限 2）

| 項目 | 単位 | 試験用試料溶液 | | | | | | | | | | |
|------------------|------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 溶液S1 | | | | | | | | | | |
| 調製濃度 | μg/L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 実測回数 | 回 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | |
| ELISA実測 (吸光度) | 1 | — | 1.009 | 0.946 | 0.976 | 1.028 | 1.010 | 0.955 | 0.968 | 1.000 | 1.009 | 1.023 |
| | 平均 | — | 0.992 | | | | | | | | | |
| 標準偏差 | μg/L | 0.029 | | | | | | | | | | |

吸光度の平均 - 3SD = 0.992 - 0.087 = 0.906

回帰式より

検出下限 2 = 8.8 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 | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 9 | 15 | 30 | 60 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | — | 1.298 | 0.995 | 0.769 | 0.417 | 0.190 |
| | 2 | — | 1.238 | 0.907 | 0.695 | 0.394 | 0.176 |
| | 3 | — | 1.196 | 0.881 | 0.688 | 0.371 | 0.177 |

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 ² |
|--------|-------|-------|-------|-------|----------------|
| 値 | 1.244 | 1.543 | 17.99 | 0.013 | 0.992 |

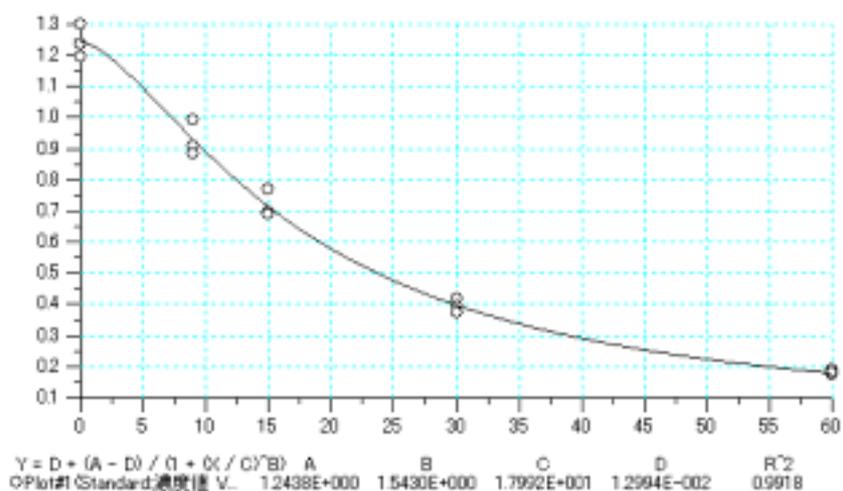


図 5.1.3 検量線

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S3 | | | | | | | | | |
| 調製濃度 | μg/L | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | | |
| 実測回数 | 回 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | | |
| ELISA 実測 | 吸光度 | 1 | — | 0.600 | 0.584 | 0.592 | 0.585 | 0.599 | 0.589 | 0.559 | 0.607 |
| | | 2 | — | 0.613 | 0.567 | 0.575 | 0.573 | 0.563 | 0.566 | 0.561 | 0.599 |
| | | 3 | — | 0.596 | 0.590 | 0.589 | 0.550 | 0.586 | 0.595 | 0.577 | 0.618 |
| | | 平均 | — | 0.603 | 0.580 | 0.585 | 0.569 | 0.583 | 0.583 | 0.566 | 0.608 |
| 換算値 | μg/L | 19.0 | 19.9 | 19.7 | 20.4 | 19.8 | 19.8 | 20.5 | 18.8 | | |
| 標準偏差 | μg/L | 0.610 | | | | | | | | | |
| 変動係数 | % | 3.1 | | | | | | | | | |

(4) 日間再現性

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 5.1.10.1 検量線用標準溶液の測定データ (1日目)

| 項目 | 単位 | 検量線用標準溶液 | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 9 | 15 | 30 | 60 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | — | 1.235 | 0.934 | 0.731 | 0.422 | 0.190 |
| | 2 | — | 1.178 | 0.886 | 0.683 | 0.397 | 0.182 |
| | 3 | — | 1.114 | 0.853 | 0.669 | 0.383 | 0.178 |

表 5.1.10.2 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 ² |
|--------|-------|-------|-------|---------|----------------|
| 値 | 1.178 | 1.476 | 19.19 | -0.0009 | 0.993 |

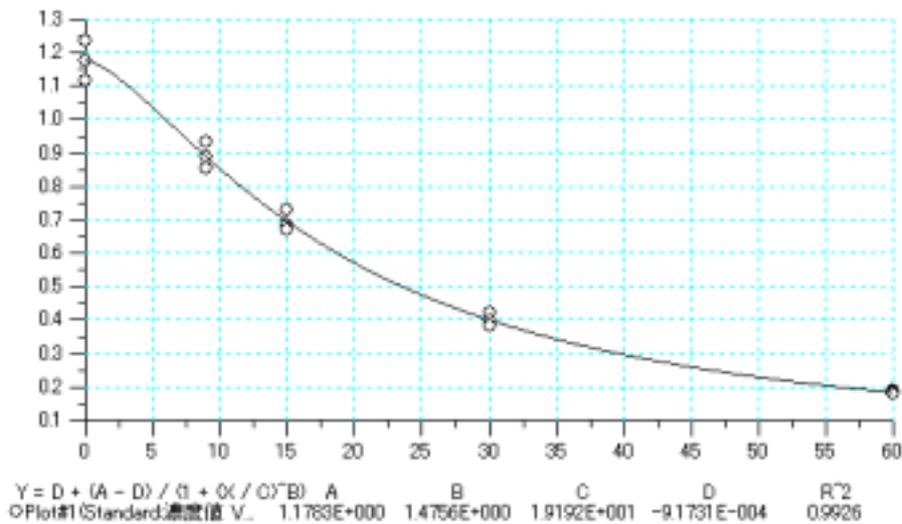


図 5.1.4.1 検量線

表 5.1.11.1 検量線用標準溶液の測定データ (3日目)

| 項目 | 単位 | 検量線用標準溶液 | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 9 | 15 | 30 | 60 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | — | 1.096 | 0.823 | 0.634 | 0.345 | 0.169 |
| | 2 | — | 1.074 | 0.770 | 0.617 | 0.343 | 0.161 |
| | 3 | — | 1.054 | 0.764 | 0.627 | 0.342 | 0.162 |

表 5.1.11.2 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 ² |
|--------|-------|-------|-------|--------|----------------|
| 値 | 1.073 | 1.462 | 18.30 | 0.0001 | 0.998 |

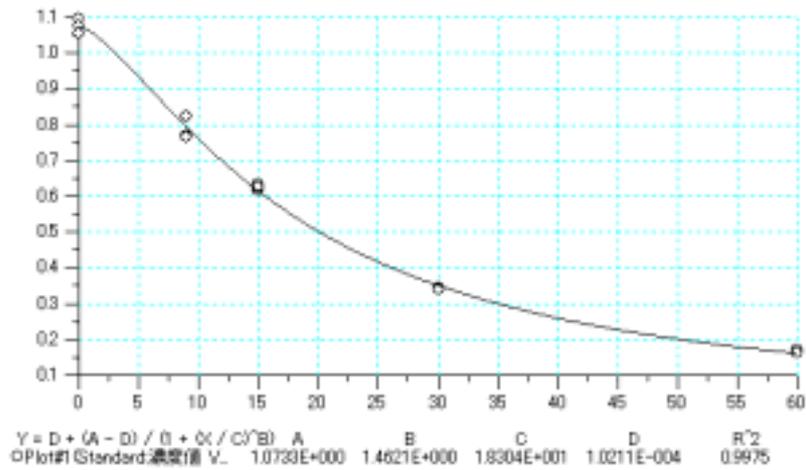


図 5.1.4.2 検量線

表 5.1.12.1 検量線用標準溶液の測定データ (5日目)

| 項目 | 単位 | 検量線用標準溶液 | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 9 | 15 | 30 | 60 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | — | 1.107 | 0.849 | 0.65 | 0.375 | 0.172 |
| | 2 | — | 1.171 | 0.815 | 0.624 | 0.369 | 0.170 |
| | 3 | — | 1.142 | 0.854 | 0.623 | 0.339 | 0.170 |

表 5.1.12.2 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 ² |
|--------|-------|-------|-------|-------|----------------|
| 値 | 1.142 | 1.435 | 17.69 | 0.002 | 0.997 |

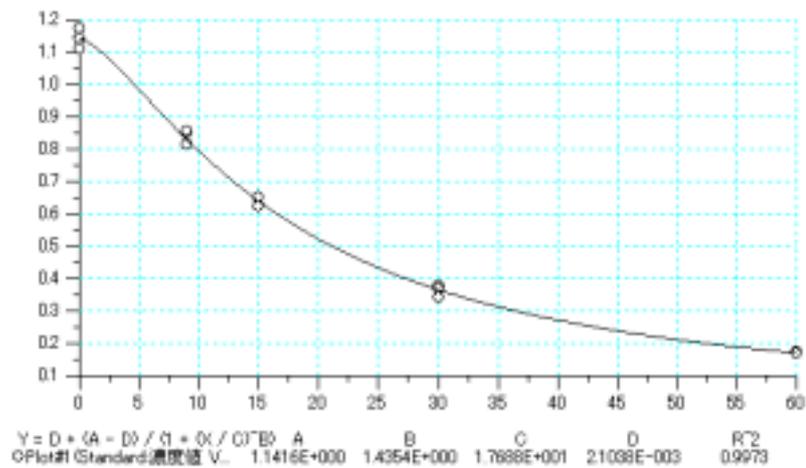


図 5.1.4.3 検量線

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 5.1.13 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 | 3 日 | 5 日 | 1 日 | 3 日 | 5 日 | 1 日 | 3 日 | 5 日 | 1 日 | 3 日 | 5 日 | 1 日 | 3 日 | 5 日 | | |
| 調製濃度 | μg/L | 0 | 0 | 0 | 9 | 9 | 9 | 15 | 15 | 15 | 30 | 30 | 30 | 60 | 60 | 60 | | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | | |
| ELISA 実測 | 吸光度 | 1 | — | 1.118 | 0.993 | 1.073 | 0.840 | 0.701 | 0.758 | 0.640 | 0.538 | 0.562 | 0.333 | 0.276 | 0.278 | 0.140 | 0.129 | 0.130 |
| | | 2 | — | 1.086 | 0.974 | 1.065 | 0.776 | 0.693 | 0.759 | 0.582 | 0.508 | 0.567 | 0.312 | 0.266 | 0.276 | 0.137 | 0.126 | 0.131 |
| | | 3 | — | 1.100 | 0.986 | 1.091 | 0.813 | 0.699 | 0.755 | 0.581 | 0.512 | 0.527 | 0.299 | 0.267 | 0.288 | 0.142 | 0.133 | 0.130 |
| | 平均 | — | 1.101 | 0.984 | 1.076 | 0.810 | 0.698 | 0.757 | 0.601 | 0.519 | 0.552 | 0.315 | 0.270 | 0.281 | 0.140 | 0.129 | 0.130 | |
| 換算値 | μg/L | 3.14 | 3.55 | 2.50 | 11.3 | 12.0 | 11.0 | 18.7 | 19.2 | 18.6 | 38.0 | 38.7 | 38.8 | 74.3 | 71.5 | 74.4 | | |
| 標準偏差 | μg/L | — | | | 0.504 | | | 0.314 | | | 0.438 | | | 1.659 | | | | |
| 変動係数 | % | — | | | 4.4 | | | 1.7 | | | 1.1 | | | 2.3 | | | | |

(5) 期間再現性

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5.1.14.1 検量線用標準溶液の測定データ(0ヶ月)

| 項目 | 単位 | 検量線用標準溶液 | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 9 | 15 | 30 | 60 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | — | 1.223 | 0.918 | 0.713 | 0.403 | 0.180 |
| | 2 | — | 1.154 | 0.902 | 0.697 | 0.366 | 0.191 |
| | 3 | — | 1.101 | 0.823 | 0.660 | 0.346 | 0.175 |

表5.1.14.2 採用した回帰式係数 $[Y=D+(A-D)/(1+(X/C)^B)]$ (0ヶ月)

| 回帰式の係数 | A | B | C | D | R ² |
|--------|-------|-------|-------|-------|----------------|
| 値 | 1.158 | 1.654 | 17.80 | 0.049 | 0.991 |

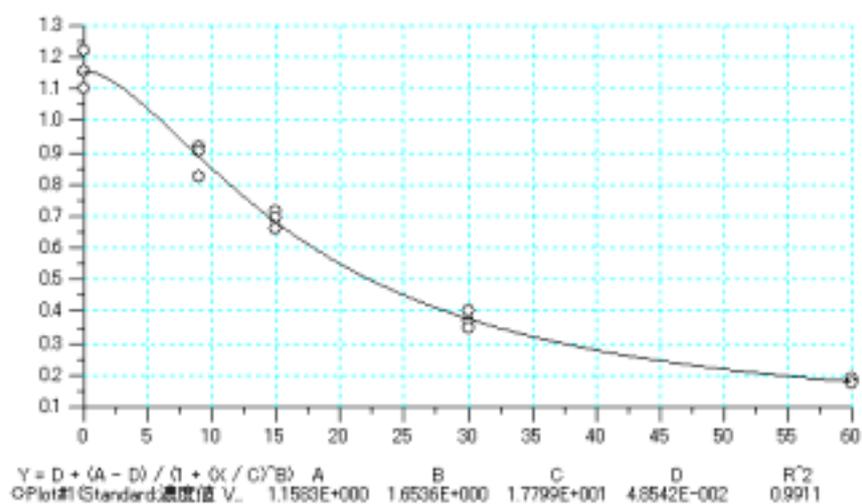


図5.1.5.1 検量線(0ヶ月)

表5.1.15.1 検量線用標準溶液の測定データ(1ヶ月)

| 項目 | 単位 | 検量線用標準溶液 | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 9 | 15 | 30 | 60 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | — | 1.180 | 0.915 | 0.733 | 0.417 | 0.189 |
| | 2 | — | 1.162 | 0.896 | 0.681 | 0.388 | 0.171 |
| | 3 | — | 1.169 | 0.875 | 0.675 | 0.368 | 0.173 |

表5.1.15.2 採用した回帰式係数 $[Y=D+(A-D)/(1+(X/C)^B)]$ (1ヶ月)

| 回帰式の係数 | A | B | C | D | R ² |
|--------|-------|-------|-------|-------|----------------|
| 値 | 1.170 | 1.576 | 18.81 | 0.018 | 0.998 |

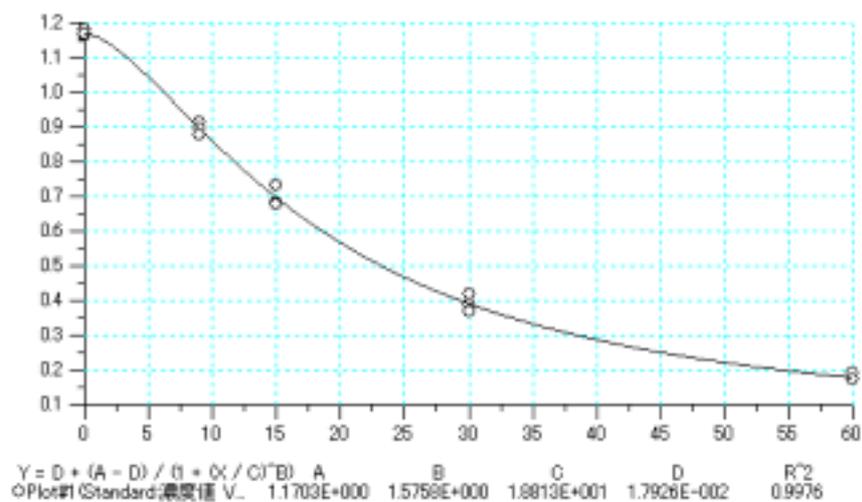


図 5.1.5.2 検量線 (1 ヶ月)

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 | | | |
| | | 0 | 1 ヶ月 | 0 | 1 ヶ月 | 0 | 1 ヶ月 | 0 | 1 ヶ月 | 0 | 1 ヶ月 | | |
| 調製濃度 | μg/L | 0 | 0 | 9 | 9 | 15 | 15 | 30 | 30 | 60 | 60 | | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | | |
| ELISA 実測 | 吸光度 | 1 | — | 1.075 | 1.124 | 0.796 | 0.799 | 0.599 | 0.598 | 0.304 | 0.295 | 0.145 | 0.139 |
| | | 2 | — | 1.063 | 1.128 | 0.796 | 0.789 | 0.567 | 0.591 | 0.285 | 0.283 | 0.139 | 0.134 |
| | | 3 | — | 1.035 | 1.172 | 0.820 | 0.825 | 0.565 | 0.591 | 0.294 | 0.297 | 0.140 | 0.140 |
| | | 平均 | — | 1.058 | 1.141 | 0.804 | 0.804 | 0.577 | 0.593 | 0.294 | 0.292 | 0.141 | 0.138 |
| 換算値 | μg/L | — | — | 11.3 | 11.6 | 18.9 | 18.8 | 38.1 | 39.4 | 75.7 | 73.9 | | |
| 標準偏差 | μg/L | — | — | 0.390 | 0.545 | 0.776 | 0.167 | 1.143 | 0.919 | 1.708 | 1.420 | | |
| 変動係数 | % | — | — | 3.5 | 4.7 | 4.1 | 0.9 | 3.0 | 2.3 | 2.3 | 1.9 | | |

(6) プレート間再現性

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 5.1.17.1 検量線用標準溶液の測定データ(プレート A)

| 項目 | 単位 | 検量線用標準溶液 | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 9 | 15 | 30 | 60 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | — | 1.223 | 0.918 | 0.713 | 0.403 | 0.180 |
| | 2 | — | 1.154 | 0.902 | 0.697 | 0.366 | 0.191 |
| | 3 | — | 1.101 | 0.823 | 0.660 | 0.346 | 0.175 |

表 5.1.17.2 採用した回帰式係数 $[Y = D + (A - D) / (1 + (X/C)^B)]$ (プレート A)

| 回帰式の係数 | A | B | C | D | R ² |
|--------|-------|-------|-------|-------|----------------|
| 値 | 1.158 | 1.654 | 17.80 | 0.049 | 0.991 |

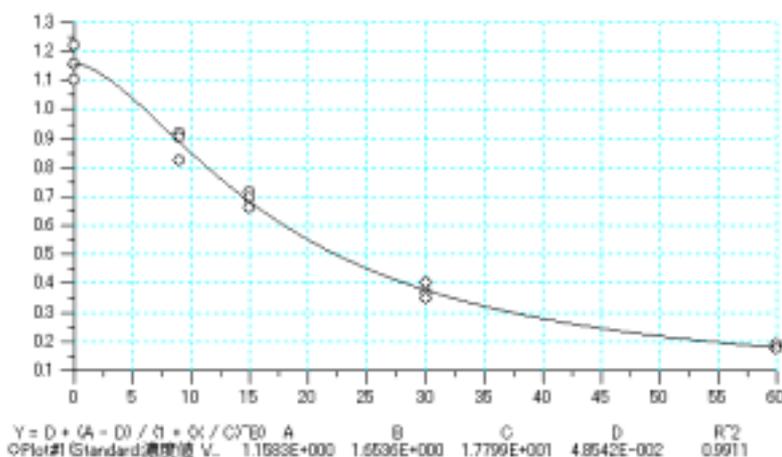


図 5.1.6.1 検量線 (プレート A)

表 5.1.18.1 検量線用標準溶液の測定データ(プレート B)

| 項目 | 単位 | 検量線用標準溶液 | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-----------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 (S4) | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 9 | 15 | 30 | 60 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | — | 1.223 | 0.907 | 0.656 | 0.406 | 0.171 |
| | 2 | — | 1.141 | 0.819 | 0.629 | 0.380 | 0.156 |
| | 3 | — | 1.112 | 0.811 | 0.652 | 0.351 | 0.161 |

表 5.1.18.2 採用した回帰式係数 $[Y = D + (A - D) / (1 + (X/C)^B)]$ (プレート B)

| 回帰式の係数 | A | B | C | D | R ² |
|--------|-------|-------|-------|--------|----------------|
| 値 | 1.161 | 1.371 | 18.73 | -0.037 | 0.992 |

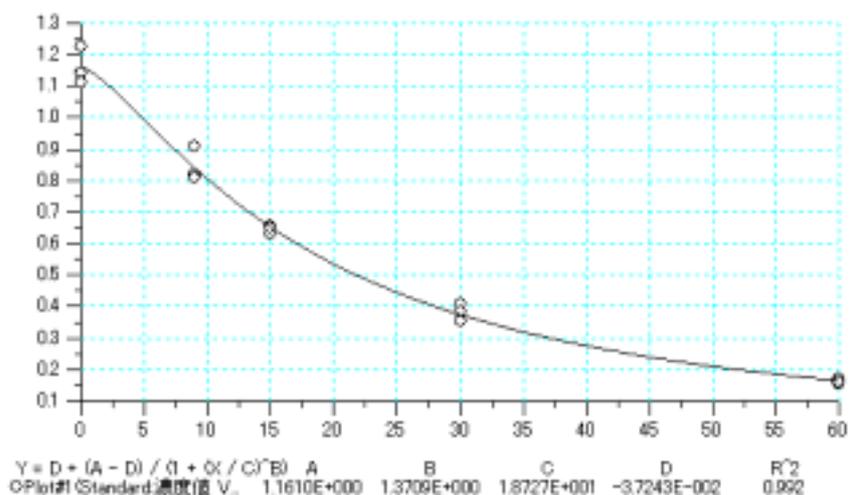


図 5.1.6.2 検量線 (プレート B)

表 5.1.19.1 検量線用標準溶液の測定データ(プレート C)

| 項目 | 単位 | 検量線用標準溶液 | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 9 | 15 | 30 | 60 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | — | 1.260 | 0.958 | 0.684 | 0.403 | 0.199 |
| | 2 | — | 1.151 | 0.876 | 0.664 | 0.365 | 0.179 |
| | 3 | — | 1.092 | 0.867 | 0.691 | 0.356 | 0.182 |

表 5.1.19.2 採用した回帰式係数[Y = D + (A - D) / (1 + (X/C)^B)] (プレート C)

| 回帰式の係数 | A | B | C | D | R ² |
|--------|-------|-------|-------|-------|----------------|
| 値 | 1.169 | 1.710 | 17.27 | 0.067 | 0.989 |

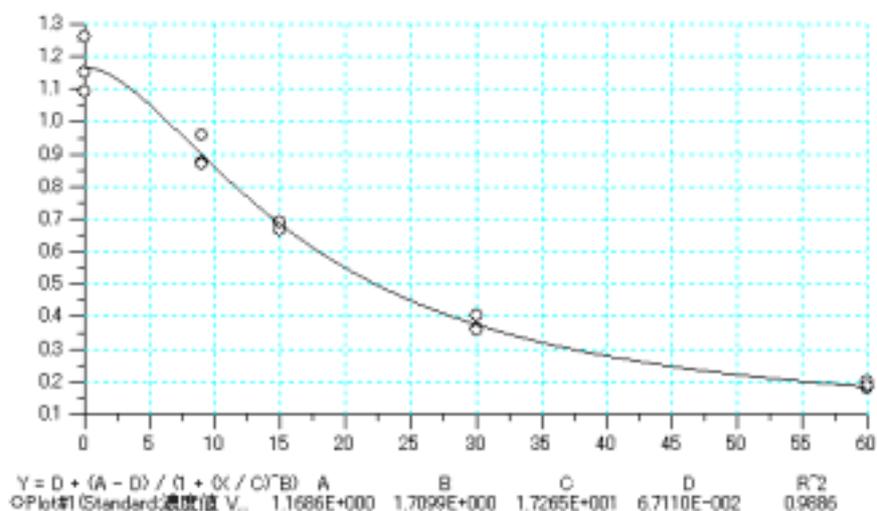


図 5.1.6.3 検量線 (プレート C)

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 5.1.20 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 A | プレート B | プレート C | | |
| 調製濃度 | μg/L | 0 | 0 | 0 | 9 | 9 | 9 | 15 | 15 | 15 | 30 | 30 | 30 | 60 | 60 | 60 | | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | | |
| ELISA 実測 | 吸光度 | 1 | — | 1.075 | 1.101 | 1.060 | 0.796 | 0.783 | 0.771 | 0.599 | 0.628 | 0.609 | 0.304 | 0.310 | 0.274 | 0.145 | 0.140 | 0.141 |
| | | 2 | — | 1.063 | 1.092 | 1.049 | 0.796 | 0.780 | 0.776 | 0.567 | 0.601 | 0.579 | 0.285 | 0.306 | 0.282 | 0.139 | 0.136 | 0.135 |
| | | 3 | — | 1.035 | 1.086 | 1.113 | 0.820 | 0.775 | 0.829 | 0.565 | 0.597 | 0.620 | 0.294 | 0.309 | 0.296 | 0.140 | 0.142 | 0.135 |
| | | 平均 | — | 1.058 | 1.093 | 1.074 | 0.804 | 0.779 | 0.792 | 0.577 | 0.609 | 0.603 | 0.294 | 0.308 | 0.284 | 0.141 | 0.139 | 0.137 |
| | 換算値 | μg/L | — | — | — | 11.3 | 10.7 | 11.8 | 18.9 | 16.7 | 17.8 | 38.1 | 36.2 | 39.3 | 75.7 | 67.3 | 83.4 | |
| 標準偏差 | μg/L | — | | | 0.519 | | | 1.083 | | | 1.596 | | | 8.065 | | | | |
| 変動係数 | % | — | | | 4.6 | | | 6.1 | | | 4.2 | | | 10.7 | | | | |

A, C:同一ロット、B:異なるロット

(7) 交差反応性

- 1 検量線作成記録(ピテルタノール)

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 5.1.21.1 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 | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 9 | 15 | 30 | 60 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | — | 1.186 | 0.906 | 0.704 | 0.406 | 0.189 |
| | 2 | — | 1.173 | 0.878 | 0.677 | 0.37 | 0.182 |
| | 3 | — | 1.145 | 0.871 | 0.655 | 0.351 | 0.168 |

表 5.1.21.2 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 ² |
|--------|-------|-------|-------|-------|----------------|
| 値 | 1.168 | 1.630 | 17.45 | 0.049 | 0.998 |

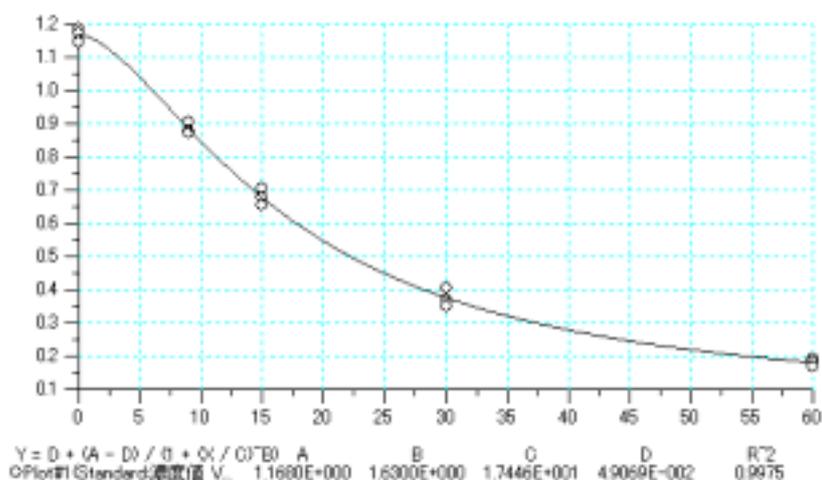


図 5.1.6.3 検量線

- 2 検量線作成記録(ピテルタノール)

表 5.1.22.1 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 | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 9 | 15 | 30 | 60 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | — | 1.173 | 0.889 | 0.669 | 0.385 | 0.170 |
| | 2 | — | 1.152 | 0.854 | 0.663 | 0.379 | 0.170 |
| | 3 | — | 1.135 | 0.825 | 0.661 | 0.355 | 0.177 |

表 5.1.22.2 採用した回帰式係数[Y = D + (A - D) / (1 + (X / C)^B)]の場合

| 回帰式の係数 | A | B | C | D | R ² |
|--------|-------|-------|-------|--------|----------------|
| 値 | 1.153 | 1.493 | 18.17 | 0.0095 | 0.998 |

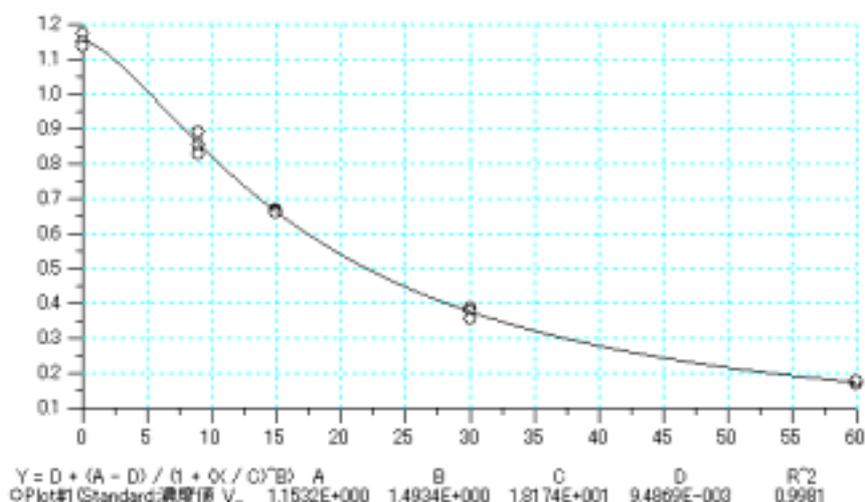


図 5.1.6.4 検量線

② 試験結果記録

本製品における類似物質の測定データは以下のとおりである。

表 5.1.23.1 対象物質の交差反応率

| 物質名 (試薬会社名) | 異性体比 (%) *1、*2 | 50%阻害濃度 ($\mu\text{g/L}$) | 交差率 (%) |
|----------------------------------|----------------------|--------------------------------|---------|
| ビテルタノール (和光純薬工業製) | A:85.3 % B:14.7 % | 18.4 | 100 |
| トリアジメノール (和光純薬工業製) | A:19.5 % B:80.5 % | 13.5 | 136 |
| トリアジメノール (Dr. Ehrenstorfer 製) | A:82.7 % B:17.3 % | 63.9 | 28.8 |
| トリアジメノール (Riedel-de Haen 製) | A:99.0 % B: 1.0 % | 697 | 2.6 |
| トリアジメホン | — | 34884 | <0.1 |

*1 異性体比は、GC/MS により測定したピーク面積の和を 100%として各異性体の割合を算出した。

*2 ビテルタノール及びトリアジメノールの異性体 A は (1R, 2S) 及び (1S, 2R) の混合物、異性体 B は (1R, 2R) 及び (1S, 2S) の混合物。

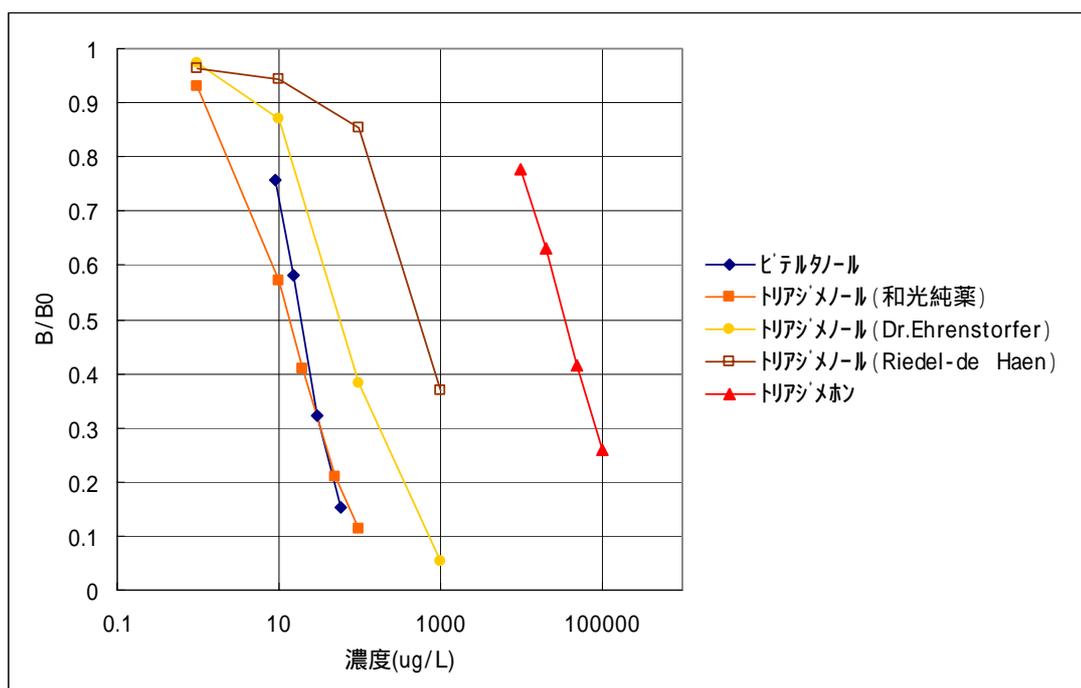


図 5.1.7 交差反応性試験結果

表 5.1.23.2 ビテルタノールの測定データ

| 項目 | 単位 | ブランク | 溶液 S1 | 溶液 S2 | 溶液 S3 | 溶液 S4 | |
|----------------------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 調製濃度 | μg/L | 0 | 9 | 15 | 30 | 60 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | — | 1.075 | 0.750 | 0.589 | 0.301 | 0.146 |
| | 2 | — | 1.083 | 0.796 | 0.582 | 0.315 | 0.137 |
| | 3 | — | 1.096 | 0.812 | 0.611 | 0.311 | 0.145 |

表 5.1.23.3 トリアジメノール (和光純薬製 : 異性体 A 19.5 % B: 80.5 %) の測定データ

| 項目 | 単位 | ブランク | 溶液 S1 | 溶液 S2 | 溶液 S3 | 溶液 S4 | 溶液 S5 | |
|----------------------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 調製濃度 | μg/L | 0 | 1 | 10 | 20 | 50 | 100 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | — | 1.176 | 1.098 | 0.645 | 0.484 | 0.244 | 0.130 |
| | 2 | — | 1.094 | 1.030 | 0.642 | 0.454 | 0.232 | 0.128 |
| | 3 | — | 1.109 | 1.018 | 0.642 | 0.441 | 0.231 | 0.129 |

表 5.1.23.4 トリアジメノール (Dr.Ehrenstorfer 製 : 異性体 A 82.7 % B: 17.3 %) の測定データ

| 項目 | 単位 | ブランク | 溶液 S1 | 溶液 S2 | 溶液 S3 | 溶液 S4 | |
|----------------------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 調製濃度 | μg/L | 0 | 1 | 10 | 100 | 1000 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | — | 1.053 | 1.020 | 0.896 | 0.401 | 0.055 |
| | 2 | — | 1.032 | 1.004 | 0.901 | 0.392 | 0.055 |
| | 3 | — | 1.045 | 1.022 | 0.927 | 0.407 | 0.057 |

表 5.1.23.5 トリアジメノール (Riedel-de Haen 製 : 異性体 A 99.0 % B: 1.0 %) の測定データ

| 項目 | 単位 | ブランク | 溶液 S1 | 溶液 S2 | 溶液 S3 | 溶液 S4 | |
|----------------------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 調製濃度 | μg/L | 0 | 1 | 10 | 100 | 1000 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | — | 1.046 | 1.018 | 0.963 | 0.892 | 0.387 |
| | 2 | — | 1.045 | 1.013 | 0.997 | 0.884 | 0.380 |
| | 3 | — | 1.052 | 1.000 | 1.008 | 0.911 | 0.390 |

表 5.1.23.6 トリアジメホンの測定データ

| 項目 | 単位 | ブランク | 溶液 S1 | 溶液 S2 | 溶液 S3 | 溶液 S4 | |
|----------------------|------|------|-------|-------|-------|--------|-------|
| 調製濃度 | μg/L | 0 | 10000 | 20000 | 50000 | 100000 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | — | 1.110 | 0.853 | 0.702 | 0.458 | 0.291 |
| | 2 | — | 1.106 | 0.878 | 0.710 | 0.462 | 0.295 |
| | 3 | — | 1.127 | 0.871 | 0.700 | 0.463 | 0.275 |

(8) その他

ビテルタノールは2つのジアステレオマーが存在し、それらの抗原抗体反応性が異なることが考えられたため、異性体B ((1R, 2R) 及び (1S, 2S) の混合物) の含有率が低い市販標準品を用いて、10%メタノール溶液を希釈溶媒として、試験用試料溶液 (0, 9, 15, 30, 60 $\mu\text{g/L}$) を調製し、各調整濃度につき3重測定を行った。

試験条件

表 5.1.24 測定条件

| 項目 | 内容 |
|-------------|--|
| 対象物質 | ビテルタノール (Riedel-de Haen 社製 ロット番号 2522X 異性体 A 98.1% B 1.9%) |
| 対象製品名 | ビテルタノール測定キット E |
| 製品番号 | ロット番号 : E-BTN 001F |
| 製造年月日 | 平成 17 年 9 月 29 日 |
| 測定範囲 (製品仕様) | 9 ~ 50 $\mu\text{g/L}$ |
| 試験日時 | 平成 18 年 2 月 10 日 10:20~13:30 |
| 試験場所 | 鳥取県生活環境部衛生環境研究所 第 5 微生物室 |
| 試験時室内温度 | 21 $^{\circ}\text{C}$ |
| 検量線用ソフト名 | LS-PLATE manager 2001 (和光純薬工業 (株) 製) |
| 試験機関担当者 | 鳥取県生活環境部衛生環境研究所 保健衛生室 研究員 金田聡子 |

ビテルタノール異性体 A は (1R, 2S) 及び (1S, 2R) の混合物、異性体 B は (1R, 2R) 及び (1S, 2S) の混合物。

② 検量線作成記録

表 5.1.25 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 | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | |
| 所定濃度 | $\mu\text{g/L}$ | 0 | 9 | 15 | 30 | 60 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | — | 1.173 | 0.889 | 0.669 | 0.385 | 0.170 |
| | 2 | — | 1.152 | 0.854 | 0.663 | 0.379 | 0.170 |
| | 3 | — | 1.135 | 0.825 | 0.661 | 0.355 | 0.177 |

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^2 |
|--------|-------|-------|-------|--------|-------|
| 値 | 1.153 | 1.493 | 18.17 | 0.0095 | 0.998 |

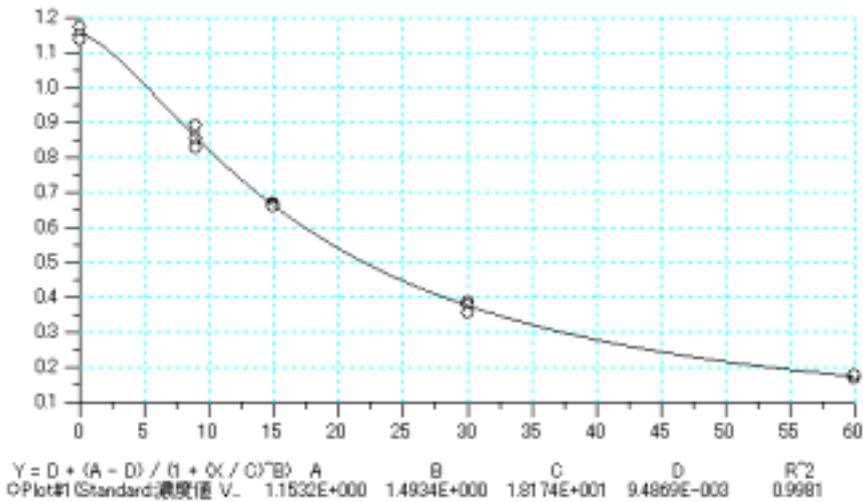


図 5.1.8 検量線

③ 試験結果記録

表 5.1.27 ビテルタノール (Riedel-de Haen 製：異性体 A 98.1% B: 1.9 %) の測定データ

| 項目 | 単位 | 溶液 S1 | 溶液 S2 | 溶液 S3 | 溶液 S4 | 溶液 S5 | |
|-------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 調製濃度 | μg/L | 0 | 9 | 15 | 30 | 60 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 | 吸光度 | 1 | 1.103 | 1.030 | 1.015 | 0.843 | 0.647 |
| | | 2 | 1.102 | 1.032 | 0.992 | 0.843 | 0.652 |
| | | 3 | 1.083 | 1.028 | 0.991 | 0.864 | 0.636 |
| | | 平均 | 1.096 | 1.030 | 0.999 | 0.850 | 0.645 |
| 換算値 | μg/L | — | 4.4 | 5.2 | 9.2 | 15.6 | |
| 標準偏差 | μg/L | — | 0.054 | 0.358 | 0.333 | 0.305 | |
| 変動係数 | % | — | 1.2 | 6.8 | 3.6 | 1.9 | |
| 相対値** | % | — | 49 | 35 | 31 | 26 | |

** 調整濃度を 100%としたときの各実測濃度 (3 重測定の前平均値) との割合 (%)

異性体 B の含有量が少ないことにより相対値が 26%~49%と減少したことから、このキットに使用されている抗体はビテルタノール異性体 B に対して高い反応性をもつことが確認された。

5.2 実用的な性能

(1) 回収特性

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 5.2.1 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 | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 9 | 15 | 30 | 60 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | — | 1.218 | 0.890 | 0.707 | 0.374 | 0.184 |
| | 2 | — | 1.131 | 0.836 | 0.674 | 0.362 | 0.171 |
| | 3 | — | 1.140 | 0.837 | 0.662 | 0.353 | 0.168 |

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 ² |
|--------|-------|-------|-------|-------|----------------|
| 値 | 1.162 | 1.521 | 17.99 | 0.012 | 0.995 |

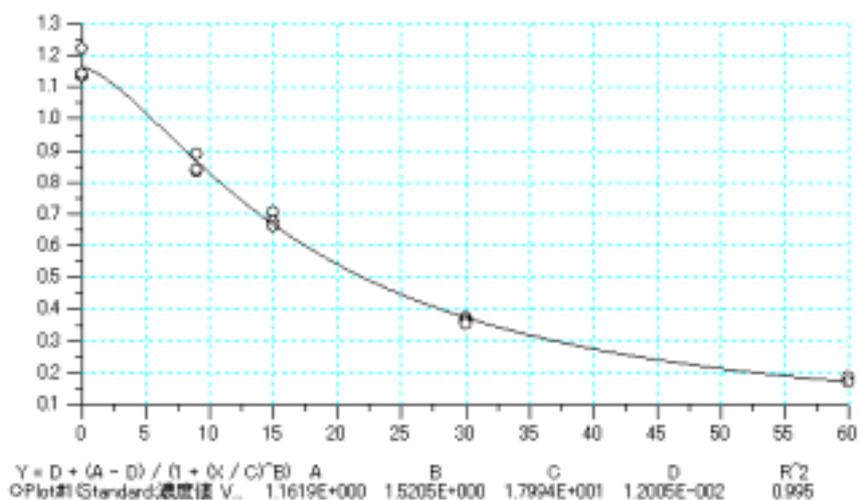


図 5.2.1 検量線

試験結果

河川水に測定範囲の中央付近（終濃度：15 μg/L）のビテルタノールを添加し、さらにフミン酸ナトリウムを添加（終濃度：0, 1, 5, 10, 50mg/L）した試験用試料溶液の測定結果は、以下のとおりであった。

表 5.2.3 回収特性の測定データ

| 項目 | | 単位 | 試験用試料溶液 | | | | | |
|---------------|-----|------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ビテルタノール添加濃度 | | μg/L | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | |
| フミン酸ナトリウム添加濃度 | | mg/L | 0 | 1 | 5 | 10 | 50 | |
| 実測回数 | | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 | 吸光度 | 1 | — | 0.591 | 0.594 | 0.590 | 0.581 | 0.530 |
| | | 2 | — | 0.589 | 0.579 | 0.587 | 0.571 | 0.522 |
| | | 3 | — | 0.585 | 0.588 | 0.582 | 0.581 | 0.519 |
| | | 平均 | — | 0.588 | 0.587 | 0.586 | 0.578 | 0.524 |
| 換算値 | | μg/L | 17.9 | 18.0 | 18.0 | 18.4 | 20.8 | |
| 標準偏差 | | μg/L | 0.125 | 0.311 | 0.167 | 0.244 | 0.273 | |
| 変動係数 | | % | 0.7 | 1.7 | 0.9 | 1.3 | 1.3 | |
| 回収率 | | % | 119 | 120 | 120 | 122 | 139 | |
| 回収影響率* | | % | 100 | 100 | 100 | 102 | 116 | |

*フミン酸ナトリウム添加濃度 0mg/L の測定値を 100%としたときの回収率

(2) 測定精度等

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 5.2.4 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 | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 9 | 15 | 30 | 60 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | — | 1.175 | 0.889 | 0.682 | 0.382 | 0.177 |
| | 2 | — | 1.139 | 0.838 | 0.642 | 0.366 | 0.171 |
| | 3 | — | 1.121 | 0.827 | 0.636 | 0.355 | 0.170 |

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 ² |
|--------|-------|-------|-------|--------|----------------|
| 値 | 1.146 | 1.452 | 18.34 | -0.003 | 0.997 |

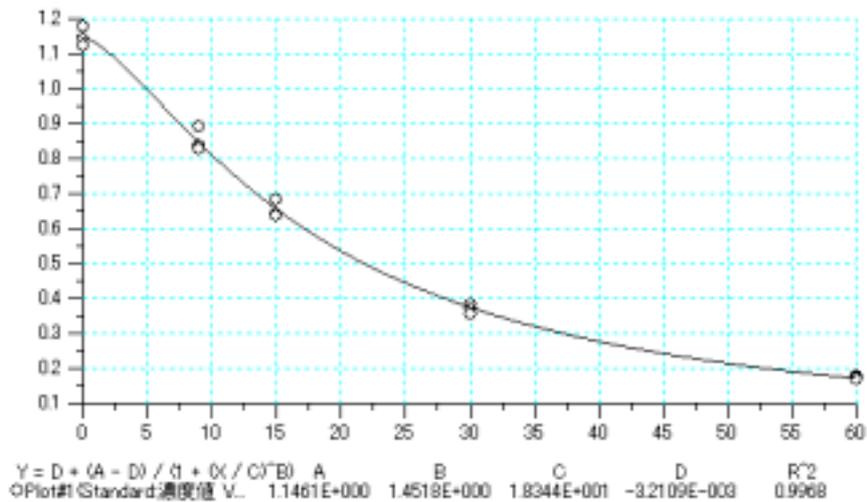


図 5.2.2 検量線

試験結果記録

河川水ろ過水（3 地点）を ELISA 法及び GC/MS 法により測定したところ、ビテルタノールは検出されなかった。

また、河川水ろ過水（3 地点）にビテルタノールを添加し、ビテルタノール濃度を $15 \mu\text{g/L}$ とした試料を測定したところ、ELISA 法では、変動係数 2.3~6.4%、回収率 116~119%であり、GC/MS 法では、変動係数 3.0~5.0%、回収率 87~90%であった。

表 5.2.6 実試料での測定結果

| 項目 | 単位 | 試験用試料溶液 | | | | |
|-----------------------|------|-----------------|-----------------|-------------|-------|----|
| | | 福光橋 (国府川) | 宮川町 (玉川) | 堺町 (鉢屋川) | | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | | |
| E L I S A | 吸光度 | 1 | 1.085 | 1.055 | 1.024 | |
| | | 2 | 1.078 | 1.073 | 1.014 | |
| | | 3 | 1.059 | 1.058 | 1.020 | |
| | | 平均 | 1.074 | 1.062 | 1.019 | |
| | 換算値 | $\mu\text{g/L}$ | — | — | — | |
| | 標準偏差 | $\mu\text{g/L}$ | — | — | — | |
| | 変動係数 | % | — | — | — | |
| G C / M S | 測定値 | 1 | $\mu\text{g/L}$ | ND | ND | ND |
| | | 2 | $\mu\text{g/L}$ | ND | ND | ND |
| | | 3 | $\mu\text{g/L}$ | ND | ND | ND |
| | | 平均 | $\mu\text{g/L}$ | — | — | — |
| | | 標準偏差 | $\mu\text{g/L}$ | — | — | — |
| | 変動係数 | % | — | — | — | |

濃度の単位は $\mu\text{g/L}$ 。ELISA の検出下限 1 は $1.1 \mu\text{g/L}$ 、検出下限 2 は $8.8 \mu\text{g/L}$ 。
GC/MS の検出下限(MDL)は、 $0.02 \mu\text{g/L}$

表 5.2.7 添加回収試験結果（ピテルタノールが 15 µg/L になるよう添加）

| 項目 | 単位 | 試験用試料溶液 | | | | |
|-----------------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------|-------|
| | | 福光橋 (国府川) | 宮川町 (玉川) | 堺町 (鉢屋川) | | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | | |
| E L I S A | 吸 光 度 | 1 | — | 0.611 | 0.618 | 0.598 |
| | | 2 | — | 0.628 | 0.618 | 0.617 |
| | | 3 | — | 0.630 | 0.669 | 0.656 |
| | | 平均 | — | 0.623 | 0.635 | 0.624 |
| | 換算値 | µg/L | 17.9 | 17.4 | 17.9 | |
| | 標準偏差 | µg/L | 0.411 | 1.104 | 1.145 | |
| | 変動係数 | % | 2.3 | 6.3 | 6.4 | |
| | 回収率 | % | 119 | 116 | 119 | |
| G C / M S | 測 定 値 | 1 | µg/L | 13.6 | 13.4 | 13.3 |
| | | 2 | µg/L | 13.3 | 13.9 | 12.8 |
| | | 3 | µg/L | 12.3 | 13.1 | 13.5 |
| | | 平均 | µg/L | 13.1 | 13.5 | 13.2 |
| | 標準偏差 | µg/L | 0.65 | 0.40 | 0.39 | |
| | 変動係数 | % | 5.0 | 3.0 | 3.0 | |
| | 回収率 | % | 87 | 90 | 88 | |

濃度の単位は µg/L。ELISA の検出下限 1 は 1.1 µg/L、検出下限 2 は 8.8 µg/L。
GC/MS の検出下限 (MDL) は、0.02 µg/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6項目（測定範囲、繰り返し再現性、日間再現性、期間再現性、プレート間再現性）において、測定濃度範囲（9～60 μ g/L）では妥当な結果が得られた。

ビテルタノール異性体B（(1R, 2R)及び(1S, 2S)の混合物）の含有率が低い市販標準品を用いて測定したところ、相対回収率が26～49%と低い値を示したことから、このキットに使用されている抗体は、異性体Bに強く反応していることが確認された。したがって、このキットは異性体Bを測定するキットであり、異性体A（(1R, 2S)及び(1S, 2R)の混合物）にも弱い交差反応性を示すものであるといえる。

交差反応性では、トリアジメノール標準品の異性体組成比の違いにより2.6～136%の交差率を示した。

(2) 一般環境モニタリングでの実用性

本試験の検討範囲においては、試料マトリックスによる影響は軽微であり、測定精度も妥当であった。

現在、上市されているビテルタノール農薬製剤は、異性体Bが20～30%含有されており、異性体A、Bは毒性及び環境中での分解性も類似した挙動を示すことがわかっている。したがって、このキットによりビテルタノール異性体Bの環境中の汚染状況を把握することは可能であると考えられた。

(3) 製品操作等の簡便性

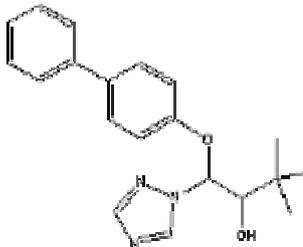
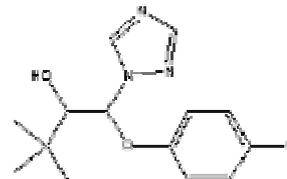
一般環境モニタリングでの使用を想定した場合、試料の前処理がない場合、約3時間で測定結果が得られ、同時に約26試料（3重測定）の測定が可能であり、本試験でのGC/MS-SIM法では、3試料（3重測定）の測定に約3日が必要であることから操作の簡便性は高いといえる。

また、製品に添付された取扱説明書は、試験操作についての記述は妥当であるが、ビテルタノール及びトリアジメノールの異性体の違いによる反応性の違いについての記載がないため使用に当たっては留意する必要がある。

付録：ビテルタノール物性表

付録：実証試験計画書

ビテルタノール物性表

| | | | |
|--|--|---|------------------|
| 実証機関 | 鳥取県 | 環境技術開発者 | (株)ホリバ・バイオテクノロジー |
| 製品の名称 | ビテルタノール測定キット E | | |
| 測定対象物質名 | ビテルタノール (Bitertanol) | | |
| 略名 | バイコラル、Baycor | | |
| 化学名 | 1-(biphenyl-4-yloxy)-3,3-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-ol (two diastereoisomers) (IUPAC) | | |
| 分子式(分子量) | C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₂ (337.42) | CAS No. | 55179-31-2 |
| 構造式 |  | | |
| 物理化学的性状*2 | 外観 | 無色結晶 | |
| | 融点*1 | 異性体 A : 136.7°C、異性体 B : 145.2°C | |
| | 蒸気圧*1 | 異性体 A : 3.8mPa、異性体 B : 3.2mPa (100°C) | |
| | 比重 | — | |
| | オクタノール / 水 分配係数*3 | 異性体 A : Log Pow = 4.04 at20°C、pH2-9 異性体 B : Log Pow = 4.15 at20°C、pH2-9 | |
| | 溶解性*1 | 異性体 A : 2.9mg/l at20°C。異性体 B : 1.6mg/l at20°C n-ヘキサン 1~10g/l、トルエン 10~50g/l、イソプロパノール 10~50g/l、ジクロロメタン 100~200 g/l at20°C。 | |
| | 安定性 | 酸性、中性、アルカリ水溶液に安定 | |
| | | *1 異性体 A : (1R, 2S) 及び (1S, 2R) の混合物、異性体 B : (1R, 2R) 及び (1S, 2S) の混合物。 | |
| 用途 | トリアゾール系農薬、殺菌剤、防かび剤、防汚剤 | | |
| 規制等 | 1986年に農薬登録。PRTR法第1種指定化学物質。 | | |
| 備考 | 交差反応物質トリアジメノール*2  Beta-(4-chlorophenoxy)-alpha-(1,1-dimethylethyl)-1H-1,2,4-triazole-1-ethanol CAS No. 55219-65-3、無色結晶、融点 : diastereomerA138.2 °C diastereomerB133.5°C、溶解性 : 水 62ppm (A) 32ppm(B)、トルエン 20-50g、 ヘキサン 0.1-1g、ジクロロメタン 100-200g、Log Pow = 3.28 | | |
| *2 出典 : 最新農薬データブック第3版 (1997年) ソフトサイエンス社 | | | |
| *3 出典 : The report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group (JMPR), held in Rome, 20-29 September 1999 | | | |

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 | 株式会社ホリバ・バイオテクノロジー |
| 技術・製品の名称 | 《技術名》 ELISA法（酵素免疫測定法） 《製品名》 ビテルタノール測定キットE |

平成17年10月

鳥 取 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 実証試験要領第2版（平成17年5月16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、実証機関及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）

鳥取県生活環境部衛生環境研究所
所長 杉本雅美

（環境技術開発者）

株式会社ホリバ・バイオテクノロジー
代表取締役社長 河野猛

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 実証試験の視点 | 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 実証対象技術の原理 | 4 |
| 3.2 実証対象製品のデータ | 4 |
| 4. 実証試験のデザイン | 5 |
| 4.1 実証試験の期間 | 5 |
| 4.2 実証試験の内容 | 6 |
| 4.3 実証対象製品の受け入れと管理 | 7 |
| 4.4 実証試験の方法 | 9 |
| (1) 基本的な性能試験 | 10 |
| ①測定範囲試験 | 10 |
| ②検出下限及び定量下限試験 | 10 |
| ③繰返し再現性試験 | 10 |
| ④日間再現性試験 | 11 |
| ⑤期間再現性試験 | 11 |
| ⑥プレート間再現性試験 | 11 |
| ⑦交差反応性試験 | 11 |
| (2) 実用的な性能試験 | 12 |
| ①回収特性試験 | 12 |
| ②測定精度試験 | 12 |
| 5. データの品質管理 | 13 |
| 6. データの管理、分析、表示 | 13 |
| 7. 監査 | 13 |
| 8. 評価 | 13 |

付録0：取扱説明書

付録1：技術仕様書

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等

付録4：品質管理マニュアル

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17年5月16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、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。

1.2 実証試験の視点

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 2.1 実証試験参加組織

| | | |
|---------|-------------|-----------------------------|
| 実証機関 | 団体名 | 鳥取県生活環境部衛生環境研究所 |
| | 住所 | 〒682-0704 鳥取県東伯郡湯梨浜町南谷526-1 |
| | 担当者所属・氏名 | 食品衛生室 室長 笥 一郎 |
| | 電話番号 | 0858-35-5411 |
| | FAX 番号 | 0858-35-5413 |
| | E-mail アドレス | kakehii@pref.tottori.jp |
| 環境技術開発者 | 企業名 | 株式会社ホリバ・バイオテクノロジー |
| | 住所 | 〒601-8315 京都市南区吉祥院車道町48番地 |
| | 担当者所属・氏名 | 試薬事業部開発・製造部 伊東 茂壽 |
| | 電話番号 | 075-692-1786 |
| | FAX 番号 | 075-692-1790 |
| | E-mail アドレス | Shigekazu.ito@horiba.com |

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。

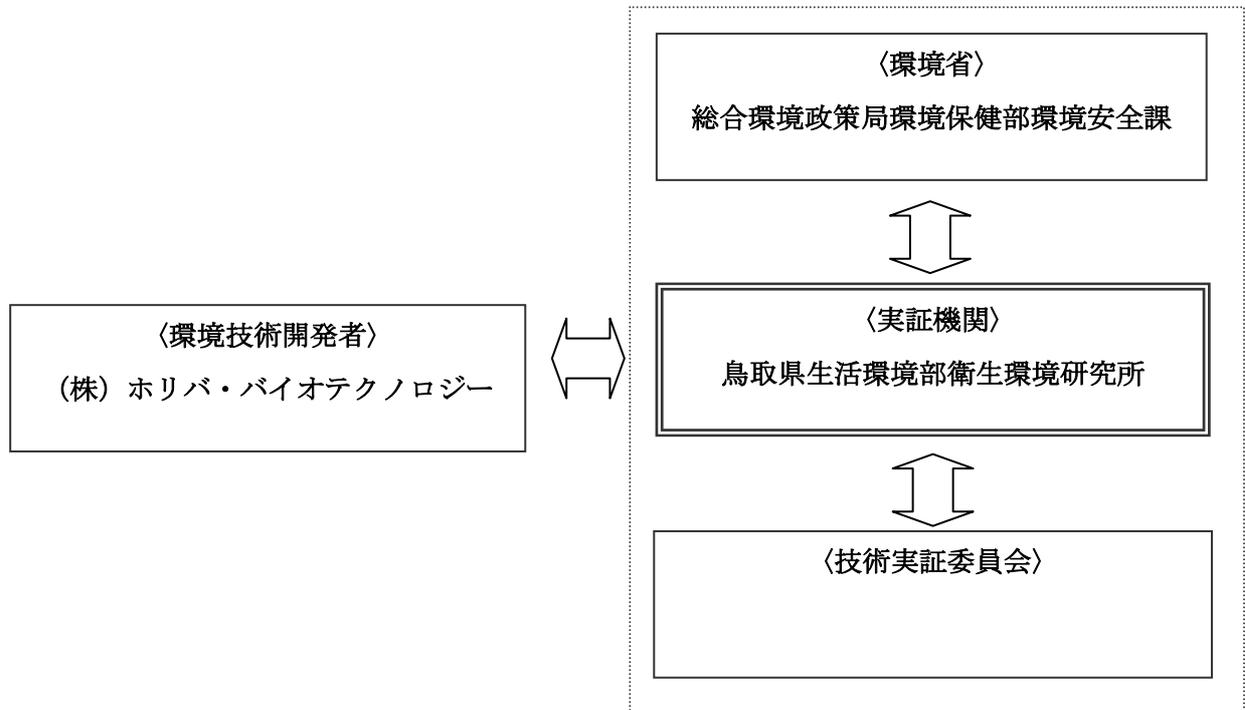


図 2.2 実証試験の実施体制

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 2.3 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 | 所長 | 杉本 雅美 |
| | 実証試験における ELISA 法の総括責任者 | 食品衛生室長 | 寛 一郎 |
| | 実証試験における ELISA 法担当者のリーダー | 食品衛生室 研究員 | 山根 一城 |
| | 実証試験における ELISA 法担当者 | 保健衛生室 研究員 | 金田 聡子 |
| | 実証試験における機器分析の総括責任者 | 食品衛生室長 | 寛 一郎 |
| | 実証試験における機器分析担当者のリーダー | 食品衛生室 研究員 | 山根 一城 |
| | 実証試験における機器分析担当者 | 水環境室 研究員 | 奥田 益算 |
| | 実証試験における機器分析担当者 | 食品衛生室 研究員 | 池井 和世 |
| | 実証試験における品質管理者 | 技術次長 | 八幡 正雄 |
| | 実証試験における品質管理担当者（内部監査員） | 保健衛生室長 | 井田 正巳 |
| 実証試験における品質管理担当者（内部監査員） | 環境化学室 特別研究員 | 牧田 尊弘 | |
| 環境技術開発者 | 実証対象製品全体の総括責任者 | 開発・製造部 部長 | 伊東 茂壽 |
| | 実証対象製品の提供 | 開発・製造部 次長 | 門脇 篤 |
| | 実証対象製品の取扱説明書等の提供 | 開発・製造部 部長 | 伊東 茂壽 |
| | 実証試験実施上の参考情報の提供 | 開発・製造部 次長 | 門脇 篤 |

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、ビテルタノールに対する特異的なモノクローナル抗体を応用した、環境水のビテルタノール測定 ELISA キットである。

ELISA の原理は、競合反応（測定対象物質濃度が高い試料では吸光度が低く、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 3.2 実証対象製品のデータ（1）

| 項目 | 記入欄 |
|-------------|--------------------|
| 製品名 | ビテルタノール測定キット E |
| 型番 | EL106-01 |
| 販売・製造元 | 株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー |
| 重量（キット一式、g） | 350g |
| 価格（円） | 99,750 円 |
| 分析対象物質 | ビテルタノール |
| 対象環境媒体 | 水質・底質・生物・その他（ ） |
| 利用用途 | 環境水その他の水質モニタリング |
| 標準試薬・種類 | 付属（調製済／調製要） |
| 操作環境（室温） | 常温（15～25℃） |
| 製品保管条件 | 2℃～8℃ |
| 製品保証期間 | 製造後 7 ヶ月間 |
| 同時測定数（最多） | 46 試料 |
| 測定時間 | 2～3 時間 |

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 | | |
| ①測定範囲 | 9~50 ppb | (付録 1) |
| ②検出下限及び定量下限 | | |
| ③繰返し再現性 | 標準偏差 : 1.9~2.3 変動係数 5.9~9.0% | (付録 1) |
| ④日間再現性 | 標準偏差 : 1.1~2.9 変動係数 3.8~15.5% | (付録 2) |
| ⑤期間再現性 | 保存安定性 | (付録 2) |
| ⑥プレート間再現性 | | |
| ⑦交差反応性 | 交差率 : 13.9% (トリアジメノール) | (付録 2) |
| ⑧その他 | | |
| 2. 実用的な性能 | | |
| ①回収特性 | 112.3~129.3% (ほうれんそう) | (付録 2) |
| ②測定精度等 | | |
| ③その他 | | |
| 試験責任者 | 伊東 茂壽 | |
| 試験年月日 | 平成 15 年 12 月 27 日 | |

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 11 月中旬~平成 17 年 12 月下旬とする。また、その期間のスケジュール (予定) は、下表に示すとおりである。

表 4.1 実証試験のスケジュール (予定)

| | 9月 | 10月 | 11月 | | | 12月 | | | 2月 | 3月 |
|----------------|----|-----|-----|----|----|-----|----|----|----|----|
| | 7日 | 3日 | 2週 | 3週 | 4週 | 1週 | 2週 | 3週 | 1週 | 3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 | | | | ○ | | | | | | |
| 検出限界及び定量限界の検討 | | | | ○ | | | | | | |
| 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 | | | | | | ○ | ○ | | | |
| 監査の実施 | | | | | | | | | | |
| 実証試験結果取りまとめ | | | | | | ○ | ○ | ○ | | |
| 実証試験中間報告 | | | | | | | | ○ | | |
| 技術実証委員会の実施 | | ○ | ○ | | | | | ○ | ○ | |
| 報告書の提出 | | | | | | | | | | ○ |

4.2 実証試験の内容

実証試験項目の内容は、表 4.2 のとおりである。

表 4.2 実証項目の内容

| 項目 | 内容 |
|----------------|--|
| 1. 基本的な性能 | |
| (1) 測定範囲 | 提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（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 | 提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（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 | 提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（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 | 提出書類の内容、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 | 提出書類の内容、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 | 提出書類の内容、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 | 提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（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 | 提出書類の内容、環境試料を模擬し市販標準品で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 | 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。 |

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

受領の記録を ELISA キット管理表（様式 4.3）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、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 キットの分割を行う場合は、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、分割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 4.3)

受領年月日 _____ 時 _____ 分

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 _____

担当者 _____

(移動・分割等の記録)

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 _____

担当者 _____

(移動・分割等の記録)

4.4 実証試験の方法

基本的な性能試験及び実用的な性能試験において、以下の操作は共通である。

ア. 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、「品質管理マニュアル」に規定した ELISA 法（ビテルタノール）の試験操作手順（一般的な事項）に従って行う。

イ. 検量線作成用標準溶液の調製

キットに付属するビテルタノール標準試薬を用い、キットが指定する調整方法で、濃度系列（以下、指定濃度系列）を作成する。

ウ. 吸光度の測定

吸光度は、マイクロプレートリーダー（TECAN 社製スペクトラサーモ）で測定し、指定濃度系列及び各試験用試料溶液の吸光度とする。

エ. 検量線の作成

波長450nm においてプレート毎に同時に測定したゼロブランク（BLK：添付の希釈液等）及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、4-parameter logistic fitting後、検量線を作成する。

オ. 実測濃度の算出

前項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

ビテルタノールの市販標準物質（和光純薬製ビテルタノール標準品（残留農薬試験用））を用いて、10%メタノールを希釈溶媒として、試験用試料溶液を調製する。

標準溶液指定濃度系列及び試験用試料溶液の調製濃度は、表 4.4.1 のとおりである。

表 4.4.1 標準溶液指定系列及び試験用試料溶液

| 試験項目 | 物質名 | 試料溶液調製濃度 |
|--|----------|-------------------------------|
| 標準溶液指定濃度系列 | ビテルタノール | 0, 5, 15, 30, 50 μ g/L |
| ①測定範囲 ④日間再現性 ⑤期間再現性 ⑥プレート間再現性 | ビテルタノール | 0, 5, 15, 30, 50 μ g/L |
| ②検出下限及び定量下限 | ビテルタノール | 5 μ g/L |
| ③繰返し再現性 | ビテルタノール | 15 μ g/L |
| ⑦交差反応性 | トリアジメノール | 0, 1, 10, 100, 1000 μ g/L |
| | トリアジメホン | 0, 10, 20, 50, 100 mg/L |

測定範囲試験

調製した試験用試料溶液を用いて、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実測濃度より、平均値、標準偏差、変動係数を求める。

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

検出下限及び定量下限試験

測定範囲の下限付近に調製した試験溶液を8回測定し、その実測濃度より標準偏差（SD）を求める。求めたSDから3SD及び10SDをそれぞれ検出下限及び定量下限とし、申請データと比較検討する。

繰返し再現性試験

測定範囲の直線域に調製した試料溶液を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個の実測濃度より平均値、標準偏差、変動係数を求める。

求めた変動係数 (n=8) から、繰返し再現性について検討する。

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「①測定範囲試験」と同じ測定操作を行う。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、3日間の比較から日間再現性について検討する。

期間再現性試験

同ロット（製造年月日と同じ）の2枚のプレートを用いて、1ヶ月以上離れた時期に「①測定範囲試験」と同じ測定操作を行う。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、プレート間の比較から期間再現性について検討する。

プレート間再現性試験

同一ロット2プレート及び異なるロット1プレートの3プレートを用いて、同日に「①測定範囲試験」と同じ測定操作を行う。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、同一ロット及び異なるロットの比較からプレート間再現性について検討する。

交差反応性試験

ビテルタノール及び類似物質（トリアジメノール、トリアジメホン）について調製した試料溶液で吸光度曲線（実測値は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。 $(\text{ビテルタノールの50\%阻害濃度} / \text{類似物質の50\%阻害濃度}) \times 100 (\%)$ 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、調製した試料溶液のみでは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。

(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（GFC：孔径 $1.2\mu\text{m}$ ）を用いて、河川水をろ過したろ液を原水とし、それに測定範囲の中央付近となるように市販標準物質（ピテルタノール）を添加するとともに、妨害物質として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製する。試験用試料溶液の調製濃度（添加濃度）は、表 4.4.2 のとおりである。

調製した試験用試料溶液について、3重測定した実測濃度から平均値、回収率を求め、フミン酸ナトリウムに対する製品の回収特性を検討する。

表 4.4.2 試験用試料溶液

| 物質名 | 試料溶液調製濃度 |
|----------------|----------------------|
| 分析対象物質：ピテルタノール | $15\mu\text{g/L}$ |
| 妨害物質：フミン酸ナトリウム | 0, 1, 5, 10, 50 mg/L |

測定精度試験

3地点から採取した河川水について、グラスファイバーフィルターによるろ過及び固相カートリッジを用いた固相抽出法による前処理を行って測定する。

同一河川水について、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法と機器分析法の実測値を比較し、環境試料への適用可能性について検討する。

また、製品の操作簡便性（測定時間、操作数）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

実証試験は、「品質管理マニュアル」に従って行い、作成した文書及び記録については、適切に保管・管理する。

6 . データの管理、分析、表示

(1) データの管理

実証試験で得られたデータは、「品質管理マニュアル」に従い識別し、適切に収集し、見出し付け、ファイリングし、10年間維持した後、廃棄するものとする。

(2) データの分析と表示

実証試験で得られたデータは、必要に応じて統計処理を行うとともに、使用した数式を実証試験結果報告書に記載する。

7 . 監査

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1回以上「品質管理マニュアル」に従い監査を実施する。

8 . 実証試験の評価

実証試験結果の評価は、3.2 実証対象製品のデータと本実証試験結果を比較し評価する。

なお、3.2 実証対象製品のデータがないものについては、ELISA 法による一般的な製品のデータを参照して評価する。

また、「実用的な性能試験」結果については、環境試料への適用性等の観点から評価する。

スマートアッセイ シリーズ

ビテルタノール測定キットE

1. はじめに

本品は、従来の機器分析法とは全く異なる原理、抗ビテルタノール抗体の特異的反応を利用した酵素免疫測定法 (Enzyme - Linked Immunosorbent Assay ; ELISA) によるビテルタノールの測定キットです。測定に必要な全ての試薬をパッケージしており、煩雑な試薬調製の必要がなく、測定したい時にすぐにお使いいただけます。

2. 測定原理

本キットは、環境水中のビテルタノールを直接競合 ELISA法で測定するものです。

ビテルタノールと特異的に反応する抗体を固相化したマイクロプレートに、ビテルタノール（標準溶液または試料溶液）とビテルタノール酵素標識物溶液の等量混合液を加えて競合反応させます。反応終了後、未反応物を洗浄除去し発色試薬を加えると、固相化抗体に結合した酵素標識物の酵素反応によって発色試薬中のテトラメチルベンジジンが酸化され、発色します。発色反応を発色停止試薬で停止させた後、450 nmの吸光度を測定します。吸光度は、標準溶液または試料溶液中のビテルタノール濃度が高いほど低下します。標準溶液のビテルタノール濃度とその吸光度の関係からビテルタノール濃度を求めます。

3. 測定キットの特徴

- 1) **高感度**—ビテルタノールを **9～50 ppb** の範囲で測定できます。
- 2) **簡便**—機器分析法に比べ試料の煩雑な前処理を必要とせず、簡易な操作で測定できます。
- 3) **迅速**—前処理が簡単なため、短時間で多くの試料を同時に測定できます。
- 4) **低コスト**—高価な機器を必要とせず、測定場所を選ばないため、コストを安くできます。

4. 測定キットの構成

1キットに含まれる試薬の内訳は、第1表の通りです。

第1表 キットの構成

| | 品名 | 容量 | 剤型 | 数量 |
|---|-------------------------|------------------------|-------|--------|
| ① | ビテルタノール抗体プレート | 8 ウェル×12 列 (96 ウェル) | 乾燥品 | 1 枚 |
| ② | ビテルタノール標準試薬 C1 (9 ppb) | 1 mL | 凍結乾燥品 | 2 バイアル |
| ③ | ビテルタノール標準試薬 C2 (15 ppb) | 1 mL | 凍結乾燥品 | 2 バイアル |
| ④ | ビテルタノール標準試薬 C3 (30ppb) | 1 mL | 凍結乾燥品 | 2 バイアル |
| ⑤ | ビテルタノール標準試薬 C4 (60ppb) | 1 mL | 凍結乾燥品 | 2 バイアル |
| ⑥ | ビテルタノール酵素標識物試薬 | 6 mL | 液状品 | 1 バイアル |
| ⑦ | 洗浄試薬 (10 倍濃縮) | 50 mL | 液状品 | 1 バイアル |
| ⑧ | 発色試薬 | 13 mL | 液状品 | 1 バイアル |
| ⑨ | 発色停止試薬 | 13 mL | | 1 バイアル |
| ⑩ | プレートシール | | | 1 枚 |

5. 測定に必要な材料・装置

(1) 試薬

- ①ビテルタノール測定キットE：ホリバ・バイオテクノロジー社製
- ②精製水
- ③メタノール：環境分析用
- ④10%メタノール：精製水を用いて10倍希釈

(2) 器具

- ①マイクロピペット (50～200 μ L, 1000 μ L) および専用チップ
- ②メスシリンダー：500 mL
- ③試験管：ガラス製、10 mL
- ④ホールピペット：ガラス製
- ⑤メスフラスコ：ガラス製
- ⑥ガラス繊維フィルター (ADVANTEC 社製 GLASS FIBER FILTER GA-55 または同等品)

(3) 装置

- ①ストップウォッチ：秒単位まで表示
- ②試験管ミキサー
- ③マイクロプレートリーダー：スマートリーダー (ホリバ・バイオテクノロジー社製)
- ④マイクロプレート洗浄機：スマートウォッシャー (ホリバ・バイオテクノロジー社製)

6. 溶液の調製

- (1) ビテルタノール抗体プレート
そのまま用います。
- (2) ビテルタノール標準溶液
ビテルタノール標準試薬C1、C2、C3およびC4に10%メタノール1 mLをマイクロピペットで加えて溶解し、それぞれビテルタノール標準溶液C1からC4とします。溶解後の濃度は、それぞれ9、15、30および60 ppbです。
- (3) ビテルタノール酵素標識物溶液
酵素標識物試薬に精製水6 mLを加えて溶解し、ビテルタノール酵素標識物溶液とします。
- (4) 洗浄溶液
洗浄試薬に、精製水450 mLをメスシリンダーで加えて希釈し、洗浄溶液とします。

付録0：取扱説明書

- (5) 発色試薬
そのまま用います。
- (6) 発色停止試薬
そのまま用います。

7. 測定操作

1) 測定方法

ろ過

試料をガラス繊維フィルター等を用いてろ過し、メタノール10%溶液を調製します。

混合液の調製

ビテルタノール標準溶液または試料溶液 150 μ L をマイクロピペットで試験管に取り、それぞれにビテルタノール酵素標識物試液 150 μ L をマイクロピペットで加えて混合し、標準混合液または試料混合液とします。

競合反応

抗体プレートのウェルに、標準混合液または試料混合液 100 μ L ずつをマイクロピペットで分注します。ついで、ストリップの使用ウェルに合わせて切断したプレートシールを貼り、室温 (15~25°C) で1時間反応させます。
*専用のマイクロプレートリーダー“スマートリーダー”を用いて測定を行う場合は、標準混合液の配置が決まっていますので、リーダーの取扱説明書に従って使用して下さい。

プレートの洗浄

反応液を吸引除去し、洗浄試液 300 μ L で3回洗浄します。
*ウェルの底に洗浄溶液が残っていないことを確認して下さい。
*測定の迅速性と定量精度を高めるため、専用の洗浄機のご使用をお勧めします。

発色反応、発色反応停止

マイクロピペットで発色試薬 100 μ L を加えて室温 (15~25°C) で10分間反応させた後、発色停止試薬 100 μ L をマイクロピペットで添加して下さい。
*発色試薬を加えると時間と共に青色に、発色停止試薬を加えると瞬時に黄色に呈色します。
*各ウェルの発色反応時間が一定になるように注意して下さい。

吸光度測定

波長 450 nm における吸光度を、マイクロプレートリーダーにより測定します。
*吸光度測定は発色反応停止後、15分以内に行ってください。
*“スマートリーダー”を使用いただくことにより、煩雑な濃度計算が自動的になされ、表示されます。

2) 試料中のビテルタノール濃度の計算

回帰式によって算出します。リーダーに付属している演算ソフト等により回帰式を求め、濃度を算出して下さい。式のYに試料の吸光度を代入しビテルタノール濃度 (X) を求めることができます。専用のマイクロプレートリーダー“スマートリーダー”を用いて算出した回帰曲線と式を例として第1図に示します。

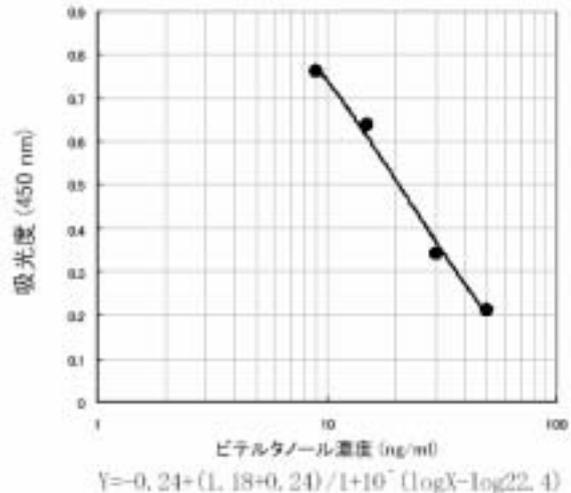


図1 回帰曲線および回帰式の例

8. 測定キットの反応特性

本キットに用いている抗体の各種農薬に対する交差反応性は、第2表の通りです。

第2表 各種農薬との交差反応性

| 農薬 | 商品例 | 交差反応性 (%) |
|------------|--------|-----------|
| ビテルタノール | バイコラル | 100 |
| トリアジメノール | | 13.9 |
| トリアジメホン | バイレトシ | <0.1 |
| ジニコナゾール | | <0.1 |
| トリフルミゾール | トリフミン | <0.1 |
| プロピコナゾール | チルト | <0.1 |
| ミクロブタニル | ラリー | <0.1 |
| フェンプロコナゾール | インダー | <0.1 |
| テトラコナゾール | ホクガード | <0.1 |
| シフルトリン | バイスロイド | <0.1 |

9. 貯法・有効期間

貯法：遮光して2~8°Cに保存します。
有効期間：パッケージの外面上に表示してあります。

10. 注意事項

使用前に、取扱説明書をよくお読みいただき、注意事項をお守りください。

1) 一般的な注意事項

- ① 本キットは、食品衛生・環境等に関わる自主検査用です。測定結果の判断と運用は、すべてお客様自身の責任で行ってください。
- ② 責任ある管理者の指導のもとに、保護手袋、保護メガネ等を着用して安全に取り扱ってください。
- ③ 吸飲したり、皮膚と接触したりすると有害な試薬類が含まれています。身体に異常を感じた場合は、直ちに医師の手当てを受けてください。
- ④ 保管・廃棄する場合には、衛生面、環境面に十分配慮し、法規を遵守してください。ビテルタノールを含む廃液、発色反応停止後の液 (希硫酸を含む) は回収し、環境中に廃棄しないでください。
- ⑤ 本キットを一度に使い切らなかった場合は、各容器を密封し、取扱説明書と共に保管してください。

付録0：取扱説明書

い。

2) 測定操作上の注意事項

- ① 本キットは、使用 30 分程前に冷蔵庫から取出し、室温に戻してからご使用ください。
- ② 異なるロットの試薬を組合わせて使用しないでください。
- ③ マイクロプレートは、各 8 ウェルずつのストリップタイプになっていますので、必要なウェル数のみを用意し、残りはラミネート袋に戻し、密封して冷蔵保存してください。また、抗体プレートを取扱う際は、裏面を汚さないようにしてください。
- ④ 正確な分析を行うため、試薬の溶解・希釈操作は可能な限り正確に行ってください。また、各反応時間を厳守してください。
- ⑤ 検量線は、測定ごとに作成してください。
- ⑥ 測定は少なくとも 2 重測定で行ってください。
- ⑦ 測定は、検量線範囲内の濃度 (9 ~50 ppb) で行って下さい。50 ppb を超える高濃度の測定試料の場合は、10%メタノールで追加希釈した後再測定してください。
- ⑧ 競合反応後の洗浄ではウェルの底に洗浄溶液が残っていないことを確認して下さい。
- ⑨ 発色および発色停止反応時の各ウェルの反応時間が一定になるように調整してください。
- ⑩ 本キットは、トリアジメノールと 13.9%の交差反応性がありますのでご注意ください。

株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー
〒601-8315 京都市南区吉祥院車道町 48 番地
TEL.075-692-1786 FAX.075-692-1790
<http://www.horiba-biotech.co.jp>

付録 1 : 技術仕様書

測定範囲の設定 (ビテルタノール)

1. 検量線作成及び測定範囲の上限値と下限値の設定

1-1. 目的

吸光度が B_0 (農薬無添加区) の20%~80%に相当する濃度を検量線から読み取り、測定範囲を設定する。

1-2. 材料

| |
|---------------|
| キット用抗体プレート |
| キット用酵素標識物試薬 |
| 検量線用標準液 |
| 発色液 (TMB試薬) |
| 発色停止液 (1N 硫酸) |

1-3. 方法

1-3-1. 抗体プレート

4°Cで保管してあるキット用抗体プレートを30分間25°Cに静置して、使用した。

1-3-2. 酵素標識物試薬の調製

4°Cで保管してあるキット用酵素標識物試薬を30分間25°Cに静置した。

↓

蒸留水6mLで溶解し、酵素標識物試薬とした。

1-3-3. 検量線溶液の調製

標準品10mgを10mLメスフラスコに入れて、メタノールでフィルアップし、1000ppm標準品メタノール溶液を調製した。

↓

メタノールで希釈し、50ppmの検量線用標準液を調製した。

↓

検量線用標準液を下表に示すように希釈し調製した。

↓

検量線溶液の調製

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------|-----|------|----|------|------|---|
| 検量線用標準液 (ppm) | 50 | 12.5 | 5 | 1.3 | 0.31 | 0 |
| 希釈後 (ppb) | 500 | 125 | 50 | 12.5 | 3.1 | 0 |

試験管に4mLの10%メタノールをとり、検量線用標準液を各試験管に40 μ l添加して、検量線溶液とした。

1-3-4. アッセイ

検量線溶液と酵素標識物溶液を等量混合して、混合試液とした。

↓

各混合試液を抗体プレートに100 μ L/well分注した。

↓

25°C 1時間静置した。

↓

吸引、洗浄3回実施した。

発色液を100 μ L/well分注した。

↓

発色反応 25°C 10分間静置した。

↓

反応停止

反応停止液100 μ L/well分注した。

↓

測定 (450nm)

※測定機：スマートリーダー

付録1：技術仕様書

1-4. 結果

(農薬添加区の吸光度) / (農薬無添加区の吸光度) の値 (B/Bo) について、
B/Bo=0.8付近の濃度 (測定下限; L) として9 ppb、及びB/Bo=0.2付近の濃度 (測定上限; H) として
50 ppbを選定して、測定範囲上限および下限を設定した。

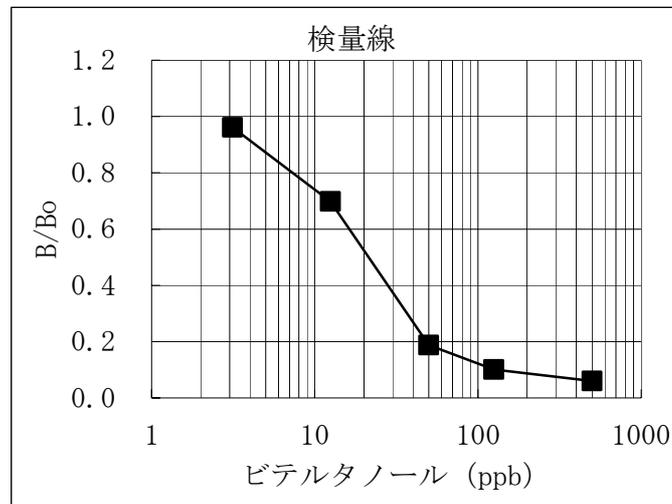


図1. ピテルタノール検量線 (B/Bo表示)

付録1：技術仕様書

測定範囲の設定（ビテルタノール）

2. 有意差検定

2-1. 目的

設定した測定範囲の下限値（9 ppb）と上限値（50 ppb）のBo及び試薬ブランクに対する有意差を確認する。

2-2. 材料

ビテルタノール測定キット

2-3. 方法

2-3-1. キットの調製

4℃保存キットを30分間25℃に静置した。

↓

酵素標識物試薬に精製水6mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。

標準試薬に10%メタノール 1.0mLを添加、溶解して標準試液（L, H）とした。

2-3-2. アッセイ

標準試液（L, H）と酵素標識物溶液、又は10%メタノールと酵素標識物溶液を等量混合して、混合試液とした。

↓

各混合試液を抗体プレートに100 μ L/well分注した。

↓

25℃ 1時間静置した。

↓

吸引、洗浄 3回実施した。

発色液を100 μ L/well分注した。

↓

発色反応 25℃ 10分間静置した。

↓

反応停止

反応停止液100 μ L/well分注した。

↓

測定（450nm）

※測定機：スマートリーダー

2-3-3. 検定方法

Boの吸光度と標準試液Lの吸光度、及び標準試液Hの吸光度と試薬ブランクの吸光度との間の t 検定（等分散と仮定した2標本による検定：有意水準＝5%）を実施した。

なお、試薬ブランクは発色液と反応停止液のみを添加したものである。

付録 1 : 技術仕様書

2-4. 結果

表1-1.

BoとLとの間の有意差検定

| | Bo | L |
|------------|------------|------------|
| 平均 | 0.989125 | 0.7805 |
| 分散 | 0.00138213 | 0.00145343 |
| 観測数 | 8 | 8 |
| プールされた分散 | 0.00141778 | |
| 仮説平均との差異 | 0 | |
| 自由度 | 14 | |
| t | 11.0813434 | |
| P(T<=t) 片側 | 1.2908E-08 | |
| t 境界値 片側 | 1.76130925 | |
| P(T<=t) 両側 | 2.5817E-08 | |
| t 境界値 両側 | 2.1447886 | |

表1-2.

Hと試薬ブランクとの間の有意差検定

| | H | 試薬ブランク |
|------------|------------|-------------|
| 平均 | 0.20475 | 0.044 |
| 分散 | 0.00018479 | 5.05714E-05 |
| 観測数 | 8 | 8 |
| プールされた分散 | 0.00011768 | |
| 仮説平均との差異 | 0 | |
| 自由度 | 14 | |
| t | 29.6368665 | |
| P(T<=t) 片側 | 2.4676E-14 | |
| t 境界値 片側 | 1.76130925 | |
| P(T<=t) 両側 | 4.9351E-14 | |
| t 境界値 両側 | 2.1447886 | |

BoとLの t 検定結果

t > t 境界値片側 であり、BoとLの間には有意差が認められた。

Hと試薬ブランクの t 検定結果

t > t 境界値片側 であり、Hと試薬ブランクの間には有意差が認められた。

2-5. 考察

t検定からBoの吸光度とLの吸光度との間、およびHの吸光度と試薬ブランクの吸光度との間に有意差があることから、測定範囲の設定の妥当性が確認できた。

付録 2：自社による性能試験結果

再現性 (ピテルタノール)

1. 目的

キットの再現性 (同時、日間) を確認する。

2. 材料

ピテルタノール測定キット

イチゴ

1000ppm 標準品メタノール溶液

3. 方法

3-1. 添加用標準液の調製

1000ppm 標準品メタノール溶液

↓

メタノールを用いて下記の表の様に添加用標準液を調製した。

添加用標準液の濃度

| | A | B | C |
|-----------|------|------|------|
| 標準液 (ppm) | 7.69 | 5.13 | 3.85 |

3-2. 測定試液の調製

農産物試料

↓

磨碎：農産物を細断し、ミキサーでペースト状にした。

↓

ペースト5gを50mL遠沈管×3個にそれぞれ正確に量りとった。

↓

添加用標準液をそれぞれ1mLずつ添加した。

↓

添加用標準液の濃度およびサンプル中の農薬濃度

↓

↓

↓

↓

↓

↓

↓

↓

↓

遠沈管のふたを閉め、よく振った。

↓

メタノール25mLを添加した。

↓

振とう機 (120回/分) で30分間振とうした。

↓

綿球を詰めたシリンジでろ過した。

ろ液を標準品を添加した農産物抽出液 (85%メタノール相当) とした。

↓

標準品を添加した農産物抽出液1mLをバイアル瓶にとり、7.5mLの蒸留水を添加し、よく混和した。(8.5倍希釈) これを測定試液とした。

3-3. キットの調製

4°Cで保管してあるキットを取り出し、30分間25°Cに静置した。

↓

酵素標識物試薬に精製水6mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。

標準試薬に10%メタノール 1.0mLを添加、溶解して標準試液とした。

付録 2 : 自社による性能試験結果

3-4. アッセイ

試験管に酵素標識物試液と測定試液、又は酵素標識物試液と標準試液を等量混合し、混合試液とした。

↓

各混合試液を抗体プレートに100 μ L/well分注した。

↓

25°C 1時間静置した。

↓

吸引、洗浄 3回実施した。

発色液を100 μ L/well分注した。

↓

発色反応 25°C 10分間静置した。

↓

反応停止

反応停止液100 μ L/well分注した。

↓

測定 (450nm)

※測定機：スマートリーダー

3-5. 同時再現性

濃度の異なる 3 試料を各々 8 点おき、各点ごとに濃度を測定して、値のばらつき具合を確認した。

3-6. 日間再現性

同一測定者が日を変えて 3 回行った。(8 重測定)

4. 結果

表2-1. 同時再現性

| | 測定値 (ppb) | | |
|---------|-----------|-------|-------|
| | 試料 A | 試料 B | 試料 C |
| 1 | 34.95 | 22.96 | 17.79 |
| 2 | 39.42 | 25.98 | 22.30 |
| 3 | 40.00 | 26.44 | 21.40 |
| 4 | 40.47 | 28.04 | 22.10 |
| 5 | 40.95 | 28.45 | 20.72 |
| 6 | 41.68 | 27.96 | 23.10 |
| 7 | 42.79 | 27.63 | 23.93 |
| 8 | 39.07 | 23.86 | 20.00 |
| 平均 | 39.92 | 26.41 | 21.42 |
| 標準偏差 | 2.34 | 2.05 | 1.93 |
| 変動係数(%) | 5.9 | 7.7 | 9.0 |

表2-2. 日間再現性

| | 測定値 (ppb) | | |
|---------|-----------|-------|-------|
| | 試料 A | 試料 B | 試料 C |
| 1日目 | 38.29 | 25.41 | 19.02 |
| 2日目 | 37.02 | 24.17 | 15.65 |
| 3日目 | 39.92 | 26.41 | 21.42 |
| 平均 | 38.41 | 25.33 | 18.70 |
| 標準偏差 | 1.45 | 1.12 | 2.90 |
| 変動係数(%) | 3.8 | 4.4 | 15.5 |

5. 考察

イチゴのホモジネートにビテルタノールを添加した3試料を用いて、同時再現性および日間再現性を検討した。結果はそれぞれ表2-1および2-2に示すとおりで、同時再現性は変動係数5.9~9.0%、日間再現性は変動係数3.8~15.5%であった。他のキットに比べて変動する傾向があるので操作を慎重に行う必要がある。

付録 2 : 自社による性能試験結果

保存安定性試験 (ビテルタノール)

1. 目的

キットの8°Cにおける保存安定性を確認する。

2. 材料

ビテルタノール測定キット : 2ロット

3. 方法

3-1. キットの調製

8°C保存キットを30分間25°Cに静置した。

↓

酵素標識物試薬に精製水6mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。

標準試薬に10%メタノール 1.0mLを添加、溶解して標準試液とした。

3-2. アッセイ

試験管に酵素標識物試液と標準試液及び酵素標識物試液と10%メタノールを等量混合して、混合試液とした。

↓

各混合試液を抗体プレートに100 μ L/well分注した。

↓

25°C 1時間静置した。

↓

吸引、洗浄 3回実施した。

発色液を100 μ L/well分注した。

↓

発色反応 25°C 10分間静置した。

↓

反応停止

反応停止液100 μ L/well分注した。

↓

測定 (450nm)

測定機 : スマートリーダー

付録2：自社による性能試験結果

4. 結果

4-1.1ロット目

表3-1 キットの保存安定性試験（1ロット目）

| | | 保存日数 | | | | | |
|----------|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 0 | 60 | 120 | 180 | 240 | 300 |
| Bo | 吸光度 | 1.148 | 0.890 | 0.958 | 1.057 | 1.060 | 1.009 |
| | SD | 0.034 | 0.006 | 0.045 | 0.039 | 0.032 | 0.027 |
| | CV(%) | 3.0 | 0.6 | 4.7 | 3.7 | 3.0 | 2.6 |
| | 相対値 [※] | 100.0% | 77.5% | 83.5% | 92.1% | 92.4% | 88.0% |
| 標準品L | 吸光度 | 0.940 | 0.722 | 0.752 | 0.876 | 0.942 | 0.838 |
| | B/Bo | 0.819 | 0.811 | 0.785 | 0.829 | 0.888 | 0.830 |
| | SD | 0.021 | 0.022 | 0.015 | 0.023 | 0.026 | 0.039 |
| | CV(%) | 2.3 | 3.1 | 2.0 | 2.6 | 2.7 | 4.7 |
| | 相対値 ^{※※} | 100.0% | 99.0% | 95.8% | 101.1% | 108.4% | 101.3% |
| 標準品H | 吸光度 | 0.237 | 0.215 | 0.245 | 0.236 | 0.241 | 0.232 |
| | B/Bo | 0.206 | 0.242 | 0.256 | 0.224 | 0.227 | 0.230 |
| | SD | 0.006 | 0.016 | 0.013 | 0.014 | 0.013 | 0.012 |
| | CV(%) | 2.6 | 7.3 | 5.5 | 5.7 | 5.2 | 5.2 |
| | 相対値 ^{※※} | 100.0% | 117.2% | 124.1% | 108.5% | 110.3% | 111.5% |
| Boコントロール | 吸光度 | 1.135 | 0.915 | 1.029 | 1.114 | 1.259 | 1.116 |
| | SD | 0.020 | 0.012 | 0.072 | 0.039 | 0.037 | 0.040 |
| | CV(%) | 1.8 | 1.3 | 7.0 | 3.5 | 2.9 | 3.6 |
| | 相対値 [※] | 100.0% | 80.7% | 90.7% | 98.1% | 111.0% | 98.3% |

4-2.2ロット目

表3-2 キットの保存安定性試験（2ロット目）

| | | 保存日数 | | | | | |
|----------|-------------------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|
| | | 0 | 60 | 120 | 180 | 240 | 300 |
| Bo | 吸光度 | 1.023 | 0.900 | 0.940 | 0.989 | 0.975 | 0.902 |
| | SD | 0.038 | 0.051 | 0.021 | 0.018 | 0.028 | 0.050 |
| | CV(%) | 3.7 | 5.6 | 2.2 | 1.8 | 2.8 | 5.6 |
| | 相対値 [※] | 100.0% | 88.0% | 91.8% | 96.7% | 95.3% | 88.2% |
| 標準品L | 吸光度 | 0.799 | 0.703 | 0.726 | 0.774 | 0.809 | 0.705 |
| | B/Bo | 0.781 | 0.782 | 0.772 | 0.782 | 0.830 | 0.781 |
| | SD | 0.024 | 0.048 | 0.045 | 0.025 | 0.030 | 0.028 |
| | CV(%) | 3.0 | 6.9 | 6.2 | 3.3 | 3.7 | 3.9 |
| | 相対値 ^{※※} | 100.0% | 100.1% | 99.0% | 100.2% | 106.4% | 100.1% |
| 標準品H | 吸光度 | 0.205 | 0.197 | 0.190 | 0.189 | 0.209 | 0.178 |
| | B/Bo | 0.200 | 0.219 | 0.202 | 0.191 | 0.214 | 0.197 |
| | SD | 0.004 | 0.014 | 0.014 | 0.007 | 0.017 | 0.008 |
| | CV(%) | 2.1 | 7.1 | 7.4 | 3.5 | 8.1 | 4.4 |
| | 相対値 ^{※※} | 100.0% | 96.1% | 92.7% | 92.1% | 101.8% | 86.6% |
| Boコントロール | 吸光度 | 1.103 | 0.925 | 1.050 | 1.095 | 1.092 | 1.046 |
| | SD | 0.032 | 0.029 | 0.034 | 0.030 | 0.016 | 0.035 |
| | CV(%) | 2.9 | 3.1 | 3.2 | 2.7 | 1.4 | 3.4 |
| | 相対値 [※] | 100.0% | 83.9% | 95.2% | 99.3% | 99.0% | 94.8% |

※ 0日目の吸光度を基準とした相対値

※※ 0日目のB/Boを基準とした相対値

5. 考察

2ロットの保存安定性試験を実施した結果、2ロットとも8℃300日保存で相対値の変動が20%以内であるので、本キットは7ヶ月使用可能である。
なお、保存試験は継続中である。

付録2：自社による性能試験結果

交差反応性（ビテルタノール）

1. 目的

本キットの、類似構造農薬及び代表的農薬の交差反応性を確認した。

2. 材料

ビテルタノール測定キット（標準試薬は除く）

対象農薬の標準品

| | |
|----|-----------|
| 1 | ビテルタノール |
| 2 | トリアジメノール |
| 3 | トリアジメホン |
| 4 | ジニコナゾール |
| 5 | トリフルミゾール |
| 6 | プロピコナゾール |
| 7 | ミクロブタニル |
| 8 | フェンブコナゾール |
| 9 | テトラコナゾール |
| 10 | シフルトリン |

3. 方法

3-1. 交差反応性測定用試液の調製

標準品をメタノールで溶解して段階希釈し希釈列を調製した。

試験管に4mLの10%メタノールをとり、希釈列を各試験管に40 μ L添加して、交差反応性測定用試液とした。

3-2. キットの調製

4 $^{\circ}$ C保存キットを30分間25 $^{\circ}$ Cに静置した。

↓

酵素標識物試薬に精製水6mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。

3-3. アッセイ

試験管に酵素標識物試液と交差反応性測定用試液を等量混合し、混合試液とした。

↓

各混合試液を抗体プレートに100 μ L/well分注した。

↓

25 $^{\circ}$ C 1時間静置した。

↓

吸引、洗浄3回実施した。

発色液を100 μ L/well分注した。

↓

発色反応 25 $^{\circ}$ C 10分間静置した。

↓

反応停止

反応停止液100 μ L/well分注した。

↓

測定（450nm）

※測定機：スマートリーダー

3-4. 交差反応性の算出

測定結果からIC₅₀値を求めたのち、交差反応性を算出した。

計算式は以下のとおりである。

交差反応性（%）= IC₅₀値（ビテルタノール） / IC₅₀値（対象農薬） × 100

付録2：自社による性能試験結果

4. 結果

表4 交差反応性一覧

| 農薬 | 交差反応性(%) |
|-----------|----------|
| ビテルタノール | 100 |
| トリアジメノール | 13.9 |
| トリアジメホン | <0.1 |
| ジニコナゾール | <0.1 |
| トリフルミゾール | <0.1 |
| プロピコナゾール | <0.1 |
| ミクロブタニル | <0.1 |
| フェンブコナゾール | <0.1 |
| テトラコナゾール | <0.1 |
| シフルトリン | <0.1 |

5. 考察

各種農薬に対する本キットの交差反応性は、表4に示す通りで、トリアジメノールが13.9%である以外は交差反応性を示さなかった。

付録 2 : 自社による性能試験結果

添加回収試験 (ビテルタノール)

1. 目的

農産物に添加したビテルタノールの回収率を確認する。

2. 材料

ビテルタノール測定キット

イチゴ

1000ppm 標準品メタノール溶液

3. 方法

3-1. 添加用標準液の調製

1000ppm 標準品メタノール溶液

↓

メタノールを用いて10ppmの添加用標準液を調製した。

3-2. 測定試液の調製

農産物試料

↓

磨砕：農産物を細断し、ミキサーでペースト状にした。

↓

ペースト5gを50mL遠沈管×3個にそれぞれ正確に量りとった。

↓

添加用標準液をそれぞれ下記の表のようにずつ添加した。

↓

添加用標準液の濃度およびサンプル中の農薬濃度

| 添加試料 | 添加用標準液 調製濃度 | ホモジネート 中農薬濃度 | 抽出・希釈 後濃度 | 添加量 |
|------|----------------|-----------------|--------------|------|
| | ppm | ppm | ppb | |
| A | 10 | 1.50 | 29.41 | 0.75 |
| B | 10 | 1.02 | 20.00 | 0.51 |
| C | 10 | 0.75 | 14.71 | 0.38 |

↓

↓

↓

↓

↓

遠沈管のふたを閉め、よく振った。

↓

メタノール25mLを添加した。

↓

振とう機 (120回/分)で30分間振とうした。

↓

綿球を詰めたシリンジでろ過した。

ろ液を標準品を添加した農産物抽出液(85%メタノール相当)とした。

↓

標準品を添加した農産物抽出液1mLをバイアル瓶にとり、7.5mLの蒸留水を添加し、よく混和した。(8.5倍希釈)これを測定試液とした。

3-3. キットの調製

4°Cで保管してあるキットを取り出し、30分間25°Cに静置した。

↓

酵素標識物試薬に精製水6mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。

標準試薬に10%メタノール 1.0mLを添加、溶解して標準試液とした。

付録 2 : 自社による性能試験結果

3-4. アッセイ

試験管に酵素標識物試液と測定試液、酵素標識物試液と標準試液及び酵素標識物試液と10%メタノールを等量混合して、混合試液とした。

↓
各混合試液を抗体プレートに100 μ L/well分注した。

↓
25 $^{\circ}$ C 1時間静置した。

↓
吸引、洗浄 3回実施した。
発色液を100 μ L/well分注した。

↓
発色反応 25 $^{\circ}$ C 10分間静置した。

↓
反応停止
反応停止液100 μ L/well分注した。

↓
測定 (450nm) 測定機 : スマートリーダー

4. 結果

表5 添加回収試験

| 添加濃度 (ppm) | 回収濃度 (ppm) | 回収率 (%) | 平均回収率 (%) |
|------------|------------|---------|------------------|
| 1.50 | 1.92 | 127.8 | 120.5 \pm 6.8 |
| | 1.79 | 119.3 | |
| | 1.72 | 114.4 | |
| 1.02 | 1.40 | 137.2 | 129.3 \pm 7.6 |
| | 1.31 | 128.7 | |
| | 1.25 | 122.1 | |
| 0.75 | 0.94 | 125.7 | 112.3 \pm 12.6 |
| | 0.83 | 110.4 | |
| | 0.76 | 100.7 | |

5. 考察

イチゴのホモジネートにピテルタノールを添加した試料について、添加回収試験を行った。結果は表5のとおり、回収率は112.3~129.3%と高めになる傾向があるが、許容範囲と考える。なお、回収率の計算は、下記のとおりである。

回収率 (%) = (添加試料の回収濃度) / (添加濃度) \times 100

付録3：参考となるその他の文書やデータ等

1. 技術の先進性について

技術の先進性、特許・実用新案等の申請・取得状況、論文発表、受賞歴等があれば記入して下さい。

技術の先進性

特開平10-182620「ビテルタノール及びその類縁化合物のハプテン化合物、抗体および測定方法」

2. その他

環境モニタリングへの適用性、将来の発展性、今後の取組等を記入して下さい。

ビテルタノールは「PRTR法対象物質」にリストアップされており、環境水での適応を確認するため申請するものです。