

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	《技術名》ELISA法（酵素免疫測定法） 《製品名》グリホサートELISAキット

平成18年3月

山 口 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)

山口県環境保健研究センター

所 長 宮村 恵宣

(要 約)

製品名称	グリホサート 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	山口県
対象物質	グリホサート
実証試験の実施期間	平成 17 年 10 月 25 日～平成 18 年 2 月 3 日

1. 実証対象技術の概要

この実証対象製品は、グリホサートに対する特異的な抗体を応用した、環境中（対象環境媒体：水質、底質、生物）のグリホサート ELISA キットである。

ELISA の原理は、競合反応（グリホサート濃度が高い試料では吸光度が低く、グリホサート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	グリホサート ELISA キット
型番	製造元コード：PN500086
販売・製造元	販売：和光純薬工業(株) 輸入：日本エンバイロケミカルズ(株) 製造：Abraxis LLC (米国)
重量 (g)	845g
価格 (円)	要照会
分析対象物質	グリホサート
対象環境媒体	水質・底質・生物 水試料以外は抽出操作が必要
利用用途	環境水のモニタリング
標準試薬・種類	付属 (調製済)
操作環境 (室温)	10 ~ 30
製品保管条件	2 ~ 8
製品保証期間	製造後 12 ヶ月間
同時測定数	43 試料 (n=2 で 1 キット使用時)
測定時間	2 時間 (固相抽出等の前処理時間を除く)

4. 実証試験結果の概要

項目	結果概要	
実証機関	山口県	
製品名称	グリホサート 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	グリホサート	
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 10 月 25 日 ~ 平成 18 年 2 月 3 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 0.15 ~ 5 µg/L での 相対値: 124.0 ~ 139.9 % 変動係数: 1.4 ~ 15.4 %	0.15 ~ 5 µg/L
検出下限 及び定量下限	調製濃度 0.15 µg/L の SD から求めた 検出下限(3SD): 0.138 µg/L 定量下限(10SD): 0.459 µg/L 0 濃度から求めた検出下限: 0.122 µg/L	検出限界: 0.1 µg/L 定量下限: 0.15 µg/L
繰返し再現性	調製濃度 1 µg/L での測定値 標準偏差: 0.106 µg/L 変動係数: 9.0%	標準偏差: 0.151 µg/L 変動係数: 10.9%
日間再現性	調製濃度 0.15 ~ 5 µg/L での測定値 標準偏差: 0.021 ~ 0.461 µg/L 変動係数: 3.5 ~ 11.3%	標準偏差: 0.063 µg/L 変動係数: 8.2%
期間再現性	調製濃度 0.15 ~ 5 µg/L での変動係数 1 回目: 1.4 ~ 15.4 % 2 回目(一ヵ月後): 2.4 ~ 8.5 %	標準偏差: 0.091 µg/L 変動係数: 11.8%
プレート間再現性	調製濃度 0.15 ~ 5 µg/L での測定値 標準偏差: 0.006 ~ 0.863 µg/L 変動係数: 2.8 ~ 13.0%	標準偏差: 0.33 µg/L 変動係数: 11.7%
交差反応性	Glyphosine 0.491 % Glufosinate ammonium 0.001% 未満 AMPA 0.013 %	阻害率 50% B/B ₀ 濃度: Glyphosine 3,000 µg/L Glufosinate 70,000 µg/L AMPA >1,000,000 µg/L
2) 実用的な性能		
回収特性	グリホサートを添加(1 µg/L)した河川水に、フミン酸ナトリウムを添加(1, 5, 10, 50mg/L)した試料の回収率(添加 0 を 100 として): 各々 98, 112, 115, 167%	環境水への添加回収実験: 平均回収率 104%
測定精度等	・河川水を直接測定: ELISA 法では不検出。 ・河川水に 0.15 µg/L, 0.5 µg/L, 1 µg/L, 5 µg/L 相当添加したときの ELISA 法回収率: 161%、116%、127%、123%	機器分析(ポストカラム誘導体化 HPLC 法)との比較: R=0.895
結果の検討と考察		
<p>1) 製品性能の信頼性: 実証試験で実施した基本性能 7 項目の全ての結果から、0.15 ~ 5 µg/L の濃度範囲においていずれの場合も測定値の方が調整濃度より高めの傾向があったが、ほぼ妥当な製品性能の信頼性を確認した。</p> <p>2) 一般環境モニタリングでの実用性: 環境試料として河川水にグリホサートを添加した実証試験結果から 0.5 µg/L 以上の濃度であれば、水質モニタリング等での実用化が可能である。</p> <p>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、誘導体化の操作を含め、約 3 時間で測定結果が得られた。また、同時に約 2.5 試料(3 重測定)の測定が可能である。</p> <p>なお、本試験での蛍光誘導体化・HPLC 法では、3 試料(3 重測定)の測定に約 1 日が必要である。</p>		

(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	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) 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	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) 検出下限及び定量下限（検出下限 1）	8
(3) 検出下限及び定量下限（検出下限 2）	9
(4) 繰返し再現性	10
(5) 日間再現性	11
(6) 期間再現性	12
(7) プレート間再現性	13
(8) 交差反応性	14
4.3 実用的な性能	15
(1) 回収特性	15
(2) 測定精度等	16

5. 試験結果	18
5.1 基本的な性能	18
(1) 測定範囲	18
(2) 検出下限及び定量下限（検出下限1）	20
(3) 検出下限及び定量下限（検出下限2）	22
(4) 繰返し再現性	23
(5) 日間再現性	25
(6) 期間再現性	27
(7) プレート間再現性	29
(8) 交差反応性	32
5.2 実用的な性能	36
(1) 回収特性	36
(2) 測定精度等	38
6. 実証試験結果の検討と考察	42
(1) 製品性能の信頼性	42
(2) 一般環境モニタリングでの実用性	42
(3) 製品操作等の簡便性	42

付録： 実証試験計画書

1. 実証試験の概要

1.1 実証対象製品の概要

表 1.1 実証対象製品のデータ

項目	内容
技術・製品の名称	グリホサート ELISA キット
実証申請者	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
実証試験実施者	山口県環境保健研究センター 所長 宮村 恵宣
実証試験実施場所	〒753-0821 山口市葵 2 丁目 5-67 山口県環境保健研究センター 薬庁舎 (ELISA 法) 〒753-0871 山口市朝田 535 山口県環境保健研究センター 大歳庁舎 (機器分析法)
実証試験実施期間	平成 17 年 10 月 25 日 ~ 平成 17 年 12 月 2 日
製品名	グリホサート ELISA キット
型番	製造元コード : PN500086
販売・製造元	販売 : 和光純薬工業 (株) 輸入 : 日本エンバイロケミカルズ (株) 製造 : Abraxis LLC (米国)
重量 (g)	845g
価格 (円)	要照会
分析対象物質	グリホサート
対象環境媒体	水質・底質・生物 水試料以外は抽出操作が必要
利用用途	環境水のモニタリング
標準試薬・種類	付属 (調製済)
操作環境 (室温)	10 ~ 30
製品保管条件	2 ~ 8
製品保証期間	製造後 12 ヶ月間
同時測定数	43 試料 (n=2 で 1 キット使用時)
測定時間	2 時間 (固相抽出等の前処理時間を除く)

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 (0.15, 0.5, 1, 5 $\mu\text{g/L}$) を測定した実測値の相対値は、124.0 ~ 139.9%、変動係数は、1.4% ~ 15.4%であった。

(製品のデータ : 0.15 ~ 5 $\mu\text{g/L}$)

検出下限及び定量下限

製品の測定下限付近 (0.15 $\mu\text{g/L}$) に調製した試験用試料溶液を繰返し測定 (3 重測定 8 回) した実測値 (濃度) の標準偏差 (SD) から求めた検出下限 (3SD) は、0.138 $\mu\text{g/L}$ 、定量下限 (10SD) は、0.459 $\mu\text{g/L}$ であった。

0 濃度で吸光度を 10 回測定して標準偏差 (SD) を求め、平均吸光度から 3SD を差し引いた吸光度に相当する濃度を検出下限とすると、検出下限は 0.122 $\mu\text{g/L}$ であった。

(製品のデータ : 検出限界は 0.1 $\mu\text{g/L}$ 、定量下限は 0.15 $\mu\text{g/L}$)

繰返し再現性

製品の測定範囲の中央付近 (1 $\mu\text{g/L}$) 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 (濃度) の変動係数は、9.0% (標準偏差 0.106 $\mu\text{g/L}$) であった。

(製品のデータ : 変動係数 10.9%、標準偏差 0.151 $\mu\text{g/L}$)

日間再現性

製品の測定範囲 (0.15 ~ 5 $\mu\text{g/L}$) に調製した試験用試料溶液を、連続した 3 日間測定した実測値 (3 重測定、濃度) の変動係数は、調製濃度 0.15 $\mu\text{g/L}$ のとき 11.3% (標準偏差 0.025 $\mu\text{g/L}$)、調製濃度 0.5 $\mu\text{g/L}$ のとき 3.5% (標準偏差 0.021 $\mu\text{g/L}$)、調製濃度 1 $\mu\text{g/L}$ のとき 6.9% (標準偏差 0.090 $\mu\text{g/L}$)、調製濃度 5 $\mu\text{g/L}$ のとき 7.1% (標準偏差 0.461 $\mu\text{g/L}$) であった。

(製品のデータ : 変動係数 8.2%、標準偏差 0.063 $\mu\text{g/L}$)

期間再現性

製品の測定範囲 (0.15 ~ 5 $\mu\text{g/L}$) に調製した試験用試料溶液を、同一ロットのプレートを用い、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 値からそれぞれ濃度を換算した 3 つの濃度間の変動係数は、1.4 ~ 15.4% (標準偏差 0.015 ~ 0.737 $\mu\text{g/L}$) であった。

(製品のデータ : 変動係数 11.8%、標準偏差 0.091 $\mu\text{g/L}$)

プレート間再現性

製品の測定範囲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, B) と、

異なるロット (C) の 1 プレートを同日に測定したプレート間の変動係数は、調製濃度 0.15 µg/L のとき 2.8% (標準偏差 0.006 µg/L) 調製濃度 0.5 µg/L のとき 13.0% (標準偏差 0.083 µg/L) 調製濃度 1 µg/L のとき 8.4% (標準偏差 0.103 µg/L) 調製濃度 5 µg/L のとき 11.9% (標準偏差 0.863 µg/L) であった。

(製品のデータ：変動係数 11.7%、標準偏差 0.33 µg/L)

交差反応性

交差反応率は、Glyphosine 0.491%、Glufosinate ammonium 0.001% 未満、AMPA 0.013% であった。

(製品のデータ：阻害率 50% B/B0 濃度は、Glyphosine 3000 µg/L、Glufosinate 70000 µg/L、AMPA >1000000 µg/L)

(2) 実用的な性能

回収特性

河川水に測定範囲の中央付近の (1 µg/L) を添加し、さらにフミン酸ナトリウムを添加 (0 および 1 ~ 50mg/L) して測定したところ、換算値は、1.371 µg/L (添加 0) 1.348 µg/L (添加 1mg/L) 1.532 µg/L (添加 5mg/L) 1.572 µg/L (添加 10mg/L) 2.292 µg/L (添加 50mg/L) であり、フミン酸ナトリウムが高濃度になると正の妨害があった。

測定精度等

環境試料として河川水 3 検体を対象とし、ELISA 法と機器分析 (HPLC) により分析を行った。この結果、ELISA 法では 3 検体とも不検出であった。

そこで、環境調査における微量濃度を想定し、河川水に、0.15 µg/L、0.5 µg/L、1 µg/L、5 µg/L 相当のグリホサートを添加して ELISA 法で測定したところ、回収率は順に 161.3%、115.6%、127.3%、122.5% であった。低濃度側が若干高めの傾向があるが、概ね良好な測定結果であり、環境調査にも適用可能であると考えられる。

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
代 表 者：代表取締役社長 小林 厚夫
担当者所属・氏名：事業開発室 室長 道正 伸
住 所：〒105-0023 東京都港区芝浦一丁目2番1号 シーバンスN館9階
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、グリホサートに特異的な抗体を応用した、環境中（対象環境媒体：水質、底質、生物）のグリホサート測定 E L I S A 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、下表に示すとおりである。

表 2.3 製品データ

項目	内容
製品名	グリホサート ELISA キット
型番	製造元コード：PN500086
販売・製造元	販売：和光純薬工業(株) 輸入：日本エンバイロケミカルズ(株) 製造：Abraxis LLC (米国)
重量 (g)	845g
価格 (円)	要照会
分析対象物質	グリホサート
対象環境媒体	水質・底質・生物 水試料以外は抽出操作が必要
利用用途	環境水のモニタリング
標準試薬・種類	付属 (調製済)
操作環境 (室温)	10 ~ 30
製品保管条件	2 ~ 8
製品保証期間	製造後 12 ヶ月間
同時測定数	43 試料 (n=2 で 1 キット使用時)
測定時間	2 時間 (固相抽出等の前処理時間を除く)

3. 実証試験実施体制

3.1 実証試験申請者

実施責任者：山口県環境生活部 環境生活部長 久保 正人
所属部署：環境生活部環境政策課環境保全室 化学物質対策班
担当者氏名：主幹 嘉村 隆
住所：〒753-8501 山口市滝町 1 番 1 号
電話番号：083-933-3034
F A X 番号：083-933-3049

3.2 実証試験実施者

実施責任者：山口県環境保健研究センター 所長 宮村 恵宣
実証試験担当者氏名：(ELISA 法)生物学部 専門研究員 吹屋 貞子
(機器分析法)水質部 主任 田中 克正
専門研究員 下濃 義弘
連絡窓口：企画情報室 室長 古谷 長藏
住所：〒753-0871 山口市朝田 5 3 5
電話番号：083-924-3670
F A X 番号：083-924-3673
e-mail アドレス：furutani.chozo@pref.yamaguchi.lg.jp

3.3 実証試験実施場所

(1) E L I S A 法

山口県環境保健研究センター 葵庁舎

(2) 機器分析法

山口県環境保健研究センター 大歳庁舎

3.4 実証試験実施期間

平成 17 年 10 月 25 日～平成 18 年 2 月 3 日

4. 試験方法

4.1 共通して行う試験操作

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。

(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 ELISA 法（グリホサート）」の試験操作手順に従って行った。

(2) 検量線作成用標準溶液

キットに付属する標準物質の希釈濃度系列（以下、指定濃度系列：調製済）を使用した。

(3) 吸光度の測定

吸光度は、マイクロプレートリーダー（バイオ・ラッド社製マイクロプレートリーダーモデル 680XR）で測定した。

(4) 検量線の作成

標準溶液指定濃度系列の吸光度（3重測定の平均値）から、ブランク（検体・抗原酵素複合体の代わりに蒸留水をプレートに加え、同様の操作を行う）を差し引き、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・ラッド社製マイクロプレートマネージャー）

(5) 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（ブランクをさしひいたもの）から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

本製品の測定範囲の試験条件は、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
対象物質	グリホサート
対象製品名	グリホサート ELISA キット
製品番号	ロット番号 5J1741
製造年月日	使用期限：2006年8月
測定範囲（製品仕様）	0.15 ~ 5 µg/L
試験日時	平成 17年 10月 31日 13:30 ~ 16:30
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎
試験時室内温度	19.5 ± 0.5
使用した市販標準品	グリホサート標準品(残留農薬試験用) 試薬会社名：和光純薬工業(株) 製品番号：071-03371 ロット番号：HSP9133
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャーIII version 1.15
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部 専門研究員 吹屋貞子

試験操作

標準品を用い、蒸留水を希釈液として、試験用試料溶液（0,0.15,0.5,1,5µg/L）を調製した。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、変動係数を求めた。

(2)検出下限及び定量下限（検出下限1）

試験条件

本製品の検出下限及び定量下限（検出下限1）の試験条件は、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（検出下限1）

項目	内容
実証項目	基本的な性能・検出下限及び定量下限
対象物質	グリホサート
対象製品名	グリホサート ELISA キット
製品番号	ロット番号 5J1741
製造年月日	使用期限：2006年8月
測定範囲（製品仕様）	0.15 ~ 5 µg/L
試験日時	平成17年11月2日 13:20 ~ 16:30
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎
試験時室内温度	21.0 ± 0.5
使用した市販標準品	グリホサート標準品(残留農薬試験用) 試薬会社名：和光純薬工業(株) 製品番号：071-03371 ロット番号：HSP9133
検量線用ソフト名	Bio-Rad Microplate Manager III version 1.15
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部 専門研究員 吹屋貞子

試験操作

標準品を用い、蒸留水を希釈液として、試験用試料溶液（0.15 µg/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8回測定し、その実測濃度より標準偏差（SD）を求めた。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た。

(3)検出下限（検出下限2）

試験条件

本製品の検出下限2の試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.3 検出下限の試験条件（検出下限2）

項目	内容
実証項目	基本的な性能・検出下限2
対象物質	グリホサート
対象製品名	グリホサート ELISA キット
製品番号	ロット番号 5J1741
製造年月日	使用期限：2006年8月
測定範囲（製品仕様）	0.15 ~ 5 µg/L
試験日時	平成 17年 10月 31日 13:30 ~ 16:30
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎
試験時室内温度	19.5 ± 0.5
使用した市販標準品等	蒸留水 残留農薬試験用 和光純薬工業（株） 製品番号:040-24081 ロット:KLK9508
検量線用ソフト名	Bio-Rad Microplate Manager III version 1.15
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部 専門研究員 吹屋貞子

試験操作

0濃度（蒸留水）の吸光度を10回測定し、吸光度の標準偏差（SD）を求めた。0濃度の平均吸光度から3SD（吸光度）を差し引いた吸光度での換算濃度を検出下限2とした。

(4) 繰り返し再現性

試験条件

本製品の繰り返し再現性の試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.4 繰り返し再現性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・繰り返し再現性
対象物質	グリホサート
対象製品名	グリホサート ELISA キット
製品番号	ロット番号 5J1741
製造年月日	使用期限：2006年8月
測定範囲（製品仕様）	0.15 ~ 5 µg/L
試験日時	平成 17 年 11 月 8 日 9:00 ~ 12:00
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎
試験時室内温度	18.0 ± 0.5
使用した市販標準品	グリホサート標準品(残留農薬試験用) 試薬会社名：和光純薬工業(株) 製品番号：071-03371 ロット番号：HSP9133
検量線用ソフト名	Bio-Rad Microplate Manager III version 1.15
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部 専門研究員 吹屋貞子

試験操作

標準品を用い、蒸留水を希釈液として、試験用試料溶液(1µg/L：測定範囲の中央付近)を調製した。調製した試験用試料溶液を8回測定(3重測定)し、その実測濃度より、平均値、標準偏差、変動係数を求め、繰り返し再現性について検討した。

(5)日間再現性

試験条件

本製品の日間再現性の試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.5 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
対象物質	グリホサート
対象製品名	グリホサート ELISA キット
製品番号	ロット番号 5J1741
製造年月日	使用期限：2006年8月
測定範囲（製品仕様）	0.15 ~ 5 µg/L
試験日時	1日目 平成17年10月31日 13:30~16:30 2日目 平成17年11月1日 14:30~17:30 3日目 平成17年11月2日 13:20~16:30
試験場所	山口県環境保健研究センター 薬庁舎
試験時室内温度	1日目 19.5 ± 0.5 2日目 20.0 ± 0.5 3日目 21.0 ± 0.5
使用した市販標準品	グリホサート標準品(残留農薬試験用) 試薬会社名：和光純薬工業(株) 製品番号：071-03371 ロット番号：HSP9133
検量線用ソフト名	Bio-Rad Microplate Manager III version 1.15
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部 専門研究員 吹屋貞子

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。

(6)期間再現性

試験条件

本製品の期間再現性の試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.6 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
対象物質	グリホサート
対象製品名	グリホサート ELISA キット
製品番号	ロット番号： 5J1741
製造年月日	使用期限： 2006 年 8 月
測定範囲（製品仕様）	0.15 ~ 5 µg/L
試験日時	1 回目 平成 17 年 10 月 31 日 13:30 ~ 16:30 2 回目 平成 17 年 12 月 2 日 9:50 ~ 12:20
試験場所	山口県環境保健研究センター 薬庁舎
試験時室内温度	1 回目 19.5 ± 0.5 2 回目 17.5 ± 1.0
使用した市販標準品	グリホサート標準品(残留農薬試験用) 試薬会社名：和光純薬工業(株) 製品番号：071-03371 ロット番号：HSP9133
検量線用ソフト名	Bio-Rad Microplate Manager III version 1.15
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部 専門研究員 吹屋貞子

試験操作

同一ロット 2 プレートについて、1 ヶ月の期間を隔てて「(1) 測定範囲」と同じ測定操作を行った。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。

(7)プレート間再現性

試験条件

本製品のプレート間再現性の試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.7 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
対象物質	グリホサート
対象製品名	グリホサート ELISA キット
製品番号	ロット番号 AおよびB : 5J1741, C : 5G1675
製造年月日	使用期限 : 2006年8月
測定範囲 (製品仕様)	0.15 ~ 5 µg/L
試験日時	A 平成17年11月8日 9:00~12:00 B 12:30~15:20 C 15:20~18:10
試験場所	山口県環境保健研究センター 薬庁舎
試験時室内温度	A 18.0 ± 0.5 B 19.0 ± 0.5 C 19.0 ± 0.5
使用した市販標準品	グリホサート標準品(残留農薬試験用) 試薬会社名 : 和光純薬工業(株) 製品番号 : 071-03371 ロット番号 : HSP9133
検量線用ソフト名	Bio-Rad Microplate Manager III version 1.15
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部 専門研究員 吹屋貞子

試験操作

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。

(8)交差反応性

試験条件

本製品の交差反応性の試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.8 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
対象物質	グリホサート
対象製品名	グリホサート ELISA キット
製品番号	ロット番号 5J1741
製造年月日	使用期限：2006年8月
測定範囲（製品仕様）	0.15 ~ 5 µg/L
試験日時	平成 17 年 11 月 21 日 11:30 ~ 14:50
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎
試験時室内温度	19.0 ± 0.5
使用した市販標準品等	グリホサート標準品(残留農薬試験用) 試薬会社名：和光純薬工業(株) 製品番号：071-03371 ロット番号：HSP9133 Glyphosine 試薬会社名：Chem Service Inc. 製品番号：PS2164 ロット番号：352-19B Glufosinate ammonium 試薬会社名：Dr.Ehrenstorfer GmbH 製品番号：CA14030000 ロット番号：31219 AMPA 試薬会社名：東京化成工業(株) 製品番号：A1072 ロット番号：FHL01
検量線用ソフト名	Bio-Rad Microplate Manager III version 1.15
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部 専門研究員 吹屋貞子

試験操作

グリホサート及び類似物質（Glyphosine、Glufosinate ammonium、AMPA）について調製した試料溶液で吸光度曲線（3重測定）を描き、それぞれの50%発色阻害濃度を求めた。

（グリホサートの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した。実用的な濃度で50%発色阻害が得られなかった場合は、より低い発色阻害率の濃度で交差率を求めた。

4.3 実用的な性能

(1)回収特性

試験条件

本製品の回収特性の試験条件は、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
対象物質	グリホサート
対象製品名	グリホサート ELISA キット
製品番号	ロット番号 5J1741
製造年月日	使用期限：2006年8月
測定範囲（製品仕様）	0.15 ~ 5 µg/L
試験日時	平成 17 年 12 月 2 日 14:50 ~ 17:30
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎
試験時室内温度	19.0
使用した市販標準品	グリホサート標準品(残留農薬試験用) 試薬会社名：和光純薬工業(株) 製品番号：071-03371 ロット番号：HSP9133
検量線用ソフト名	Bio-Rad Microplate Manager III version 1.15
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部 専門研究員 吹屋貞子

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
2	一の坂川	平成 17 年 11 月 28 日	4L×3本	pH 8.0 COD 1.7mg/L

試験操作

GF/C 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グリホサートを添加(1µg/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

(2)-1 実試料分析

試験条件

本製品の測定精度等の試験条件は、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・実試料分析
対象物質	グリホサート
対象製品名	グリホサート ELISA キット
製品番号	ロット番号 5J1741
製造年月日	使用期限：2006年8月
測定範囲（製品仕様）	0.15 ~ 5 µg/L
試験日時	平成17年11月30日 10:10 ~ 12:50
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎 山口県環境保健研究センター 大歳庁舎
試験時室内温度	18.0 ± 0.5
使用した市販標準品	グリホサート標準品(残留農薬試験用) 試薬会社名：和光純薬工業(株) 製品番号：071-03371 ロット番号：HSP9133
検量線用ソフト名	Bio-Rad Microplate Manager III version 1.15
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部 専門研究員 吹屋貞子 山口県環境保健研究センター水質部 主任 田中克正 山口県環境保健研究センター水質部 専門研究員 下濃義弘

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
1	九田川	平成17年11月28日	4L×3本	pH 8.8, COD 3.6mg/L
2	一の坂川	平成17年11月28日	4L×3本	pH 8.0, COD 1.7mg/L
3	前田川	平成17年11月28日	4L×3本	pH 7.0, COD 2.0mg/L

河川水は、GF/Cを用いてろ過したものを試料として使用した。

試験操作

ELISA法は試料そのままを測定対象とし、機器分析は試料50ml分取し、蛍光誘導体化後、HPLC・蛍光検出器（励起波長270nm、測定波長315nm）により測定を行った。

なお、HPLC条件は、カラム Shimpack CLC-NH₂(M) (150mmL. × 4.6mm)、溶離液 0.1mKH₂PO₄:CH₃CN(7:3)、流速 1.0ml/min、カラム温度 40℃、試料注入量 20µlとした。

(2)-2 実試料添加試験

試験条件

本製品の測定精度等の試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.3.5 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・実試料添加試験
対象物質	グリホサート
対象製品名	グリホサート ELISA キット
製品番号	ロット番号 5J1741
製造年月日	使用期限：2006年8月
測定範囲（製品仕様）	0.15 ~ 5 µg/L
試験日時	平成 18 年 2 月 3 日 13:40 ~ 16:20
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎 山口県環境保健研究センター 大歳庁舎
試験時室内温度	19.5 ± 0.5
使用した市販標準品	グリホサート標準品(残留農薬試験用) 試薬会社名：和光純薬工業(株) 製品番号：071-03371 ロット番号：HSP9133
検量線用ソフト名	Bio-Rad Microplate Manager III version 1.15
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部 専門研究員 吹屋貞子 山口県環境保健研究センター水質部 主任 田中克正 山口県環境保健研究センター水質部 専門研究員 下濃義弘

表4.3.6 使用した環境試料

試料番号	地点名	採水日	採水量	備考
4	二ツ堂川	平成 18 年 1 月 10 日	4L × 4 本	pH 6.5 , COD 0.5mg/L

試験操作

環境調査において当 ELISA キットが適用できるかどうか確認するため、標準品の添加実験を行った。グリホサートの添加濃度は、0、0.15、0.5、1、1.5 µg/L とし、ELISA 法で 3 重測定した。(グリホサートの水道水の水質管理目標値は 2mg/L であり、当キットの感度は十分であるが、環境水レベルでの適用性を確認するため、このような濃度レベルとした。)

なお、使用した河川水は、事前に ELISA 法でグリホサートが検出されないことを確認したものであり、懸濁物の影響を避けるため、採取日当日にグラスファイバーフィルター (GFC：孔径 1.2 µm) を用いてろ過したものを冷暗所保存し使用した。

5. 試験結果

5.1 基本的な性能

(1) 測定範囲

この試験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	試験用試料溶液					
		STD0	STD1	STD2	STD3	STD4	
所定濃度	μg/L	0	0.15	0.5	1	5	
実測回数	回	3					
ELISA 実測 (吸光度*)	1	-	1.458	1.195	0.951	0.739	0.256
	2	-	1.483	1.278	1.025	0.713	0.224
	3	-	1.537	1.329	1.005	0.722	0.242

* : ブランクの吸光度を差し引いたもの

採用した回帰式 (Y : 吸光度 X : 濃度(μg/L))

$$Y = (-0.043 - 1.490) / (1 + (X / 1.035)^{-0.945}) + 1.490 \quad R^2 = 0.999$$

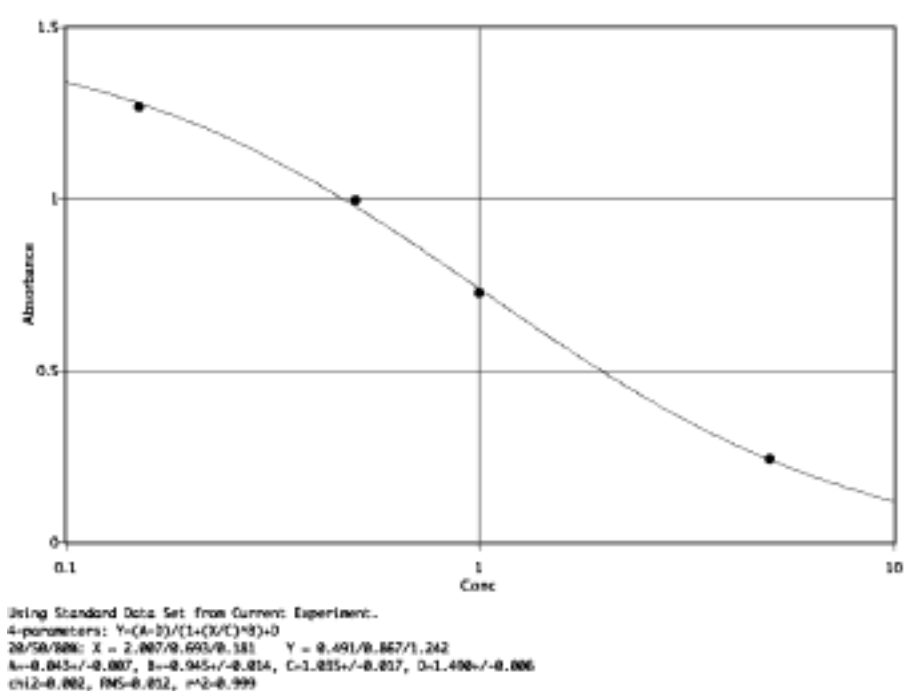


図 5.1.1 検量線

この試験における測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.2 試料溶液の測定データ (測定範囲)

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	0.15	0.5	1	5		
実測回数	回	3						
ELISA 実測	吸光度	1	-	1.465	1.195	0.882	0.571	0.186
		2	-	1.492	1.257	0.893	0.606	0.191
		3	-	1.485	1.234	0.941	0.668	0.189
		平均	-	1.481	1.229	0.905	0.615	0.189
	換算値	μg/L	0.005	0.194	0.620	1.399	6.424	
標準偏差	μg/L	-	0.030	0.056	0.191	0.087		
変動係数	%	-	15.4	9.0	13.5	1.4		
相対値**	%	-	129.3	124.0	139.9	128.5		

* ブランクの吸光度を差し引いたもの ** 調製濃度を 100%としたときの各実測濃度の割合 (%)

調製濃度 0.15 ~ 5 μg/L での変動係数は 1.4 ~ 15.4 %、相対値は 124.0 ~ 139.9 % であった。

(2) 検出下限及び定量下限（検出下限1）

この試験における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

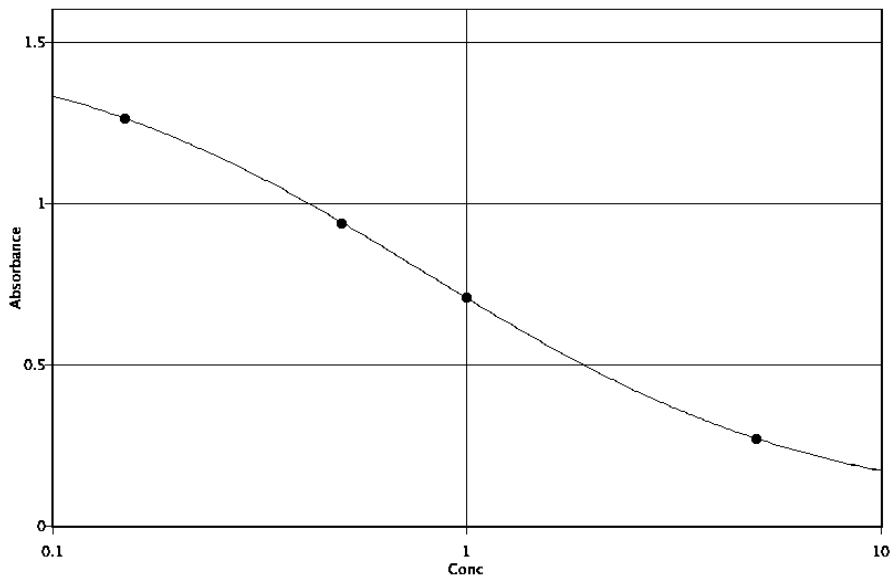
表 5.1.3 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液					
		STD0	STD1	STD2	STD3	STD4	
所定濃度	μg/L	0	0.15	0.5	1	5	
実測回数	回	3					
ELISA 実測 (吸光度*)	1	-	1.596	1.361	0.970	0.752	0.270
	2	-	1.498	1.205	0.894	0.688	0.265
	3	-	1.477	1.222	0.952	0.680	0.273

*: ブランクの吸光度を差し引いたもの

採用した回帰式 (Y: 吸光度 X: 濃度(μg/L))

$$Y = (0.035 - 1.523) / (1 + (X / 0.805)^{-0.919}) + 1.523 \quad R^2 = 1.000$$



Using Standard Data Set from Current Experiment.
 4-parameters: $Y=(A-D)/(1+(X/C)^B)+D$
 20/50/80%: $X = 1.777/0.570/0.142$ $Y = 0.520/0.896/1.272$
 $A=0.035\pm/0.000$, $B=-0.919\pm/0.001$, $C=0.805\pm/0.001$, $D=1.523\pm/0.001$
 $\chi^2=0.000$, $RMS=0.001$, $r^2=1.000$

図 5.1.2 検量線

この試験における測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.4 試料溶液の測定データ（検出下限・定量下限）

項目		単位	試験用試料溶液								
調製濃度		μg/L	0.15								
実測回数		回	3								
ELISA 実測	吸光度	1	-	1.313	1.223	1.133	1.218	1.266	1.265	1.151	1.241
		2	-	1.183	1.271	1.036	1.203	1.350	1.277	1.170	1.159
		3	-	1.182	1.281	1.201	1.126	1.201	1.242	1.162	1.282
		平均	-	1.226	1.258	1.123	1.182	1.272	1.261	1.161	1.227
	換算値	μg/L	0.178	0.153	0.271	0.215	0.142	0.151	0.235	0.177	
標準偏差		μg/L	0.046								

* ブランクの吸光度を差し引いたもの

0.15 μg/L（測定範囲の下限付近濃度）の測定値（換算値）より求めた検出下限及び定量下限は、次のとおりである。

$$\text{検出下限 (3SD)} = 0.138 \text{ } \mu\text{g/L (検出下限 1)}$$

$$\text{定量下限 (10SD)} = 0.459 \text{ } \mu\text{g/L}$$

(3) 検出下限 (検出下限 2)

検量線用標準液の測定データは(1)測定範囲のものと同じ。(表 5.1.1)

採用した回帰式 (Y: 吸光度 X: 濃度(μg/L))

$$Y = (-0.043 - 1.490) / (1 + (X / 1.035)^{-0.945}) + 1.490 \quad R^2 = 0.999$$

この試験における測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.5 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										
調製濃度	μg/L	0										
実測回数	回	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ELISA 実測 吸光度*	-	1.461	1.460	1.463	1.367	1.505	1.434	1.494	1.532	1.551	1.437	
平均		1.470										
標準偏差	μg/L	0.053										

*: ブランクの吸光度を差し引いたもの

0 濃度の測定値 (換算値) より求めた検出下限は、次のとおりである。

$$\text{平均 OD} - 3\text{SD} = 1.470 - 3 \times 0.053 = 1.311$$

回帰式より、吸光度 1.311 の時の濃度は、0.122 μg/L (検出下限 2)

(4) 繰り返し再現性

この試験における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

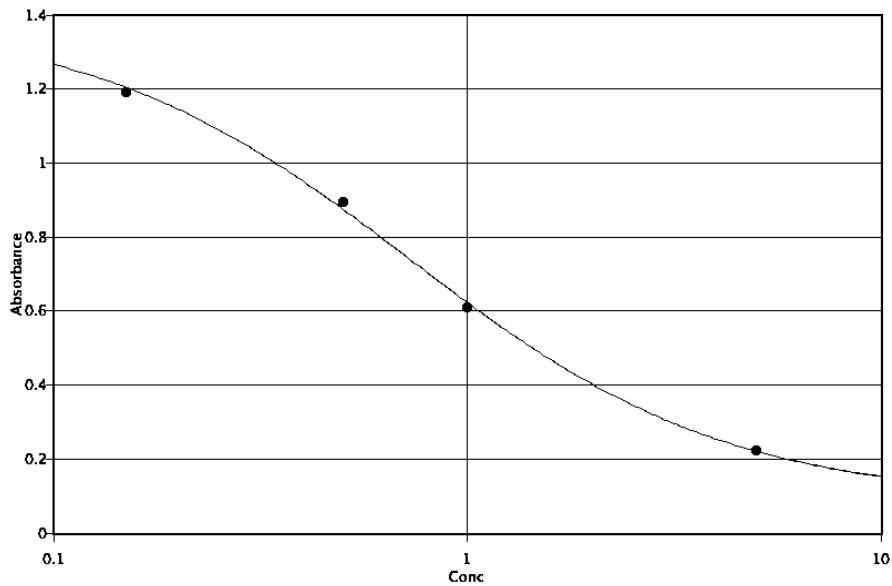
表 5.1.6 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液					
		STD0	STD1	STD2	STD3	STD4	
調製濃度	μg/L	0	0.15	0.5	1	5	
実測回数	回	3					
ELISA 実測 (吸光度*)	1	-	1.324	1.214	0.927	0.658	0.218
	2	-	1.425	1.233	0.846	0.583	0.228
	3	-	1.435	1.128	0.910	0.588	0.222

* : ブランクの吸光度を差し引いたもの

採用した回帰式 (Y : 吸光度 X : 濃度(μg/L))

$$Y = (0.088 - 1.390) / (1 + (X / 0.727)^{-1.131}) + 1.390 \quad R^2 = 0.999$$



Using Standard Data Set from Current Experiment.
 4-parameters: $Y=(A-D)/(1+(X/C)^B)+D$
 20/50/80%: $X = 1.652/0.602/0.187$ $Y = 0.457/0.808/1.160$
 $A=0.088\pm0.007$, $B=-1.131\pm0.024$, $C=0.727\pm0.014$, $D=1.390\pm0.008$
 $\chi^2=0.002$, $RMS=0.014$, $r^2=0.999$

図 5.1.3 検量線

この試験における測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.7 試料溶液の測定データ（繰り返し再現性）

項目		単位	試験用試料溶液									
調製濃度		μg/L	1									
実測回数		回	3									
ELISA 実測	吸光度	1	-	0.558	0.605	0.589	0.546	0.597	0.576	0.538	0.567	
		2	-	0.527	0.576	0.634	0.542	0.616	0.537	0.508	0.512	
		3	-	0.545	0.642	0.553	0.554	0.604	0.602	0.549	0.533	
		平均	-	0.543	0.607	0.592	0.547	0.605	0.571	0.531	0.537	
	換算値	μg/L	1.259	1.045	1.093	1.244	1.051	1.159	1.304	1.282		
平均値		μg/L	1.180									
標準偏差		μg/L	0.106									
変動係数		%	9.0									

* ブランクの吸光度を差し引いたもの

8 回測定（3 重測定）した測定値（換算値）の標準偏差は 0.106 μg/L、変動係数は 9.0% であった。

(5) 日間再現性

この試験における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

1 日目の検量線用標準溶液の測定データおよび回帰式：

(1) 測定範囲のものと同じ。(表 5.1.1)

2 日目の検量線用標準溶液の測定データおよび回帰式：

表 5.1.8 及び 図 5.1.4 のとおり。

3 日目の検量線用標準溶液の測定データおよび回帰式：

(2) 検出下限及び定量下限のものと同じ。(表 5.1.3)

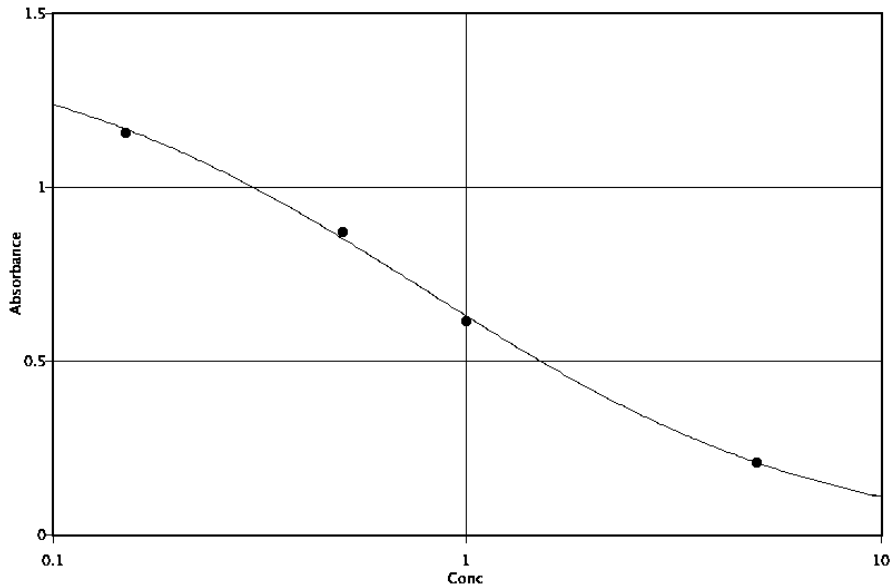
表 5.1.8 検量線用標準溶液の測定データ(2 日目)

項目	単位	試験用試料溶液					
		STD0	STD1	STD2	STD3	STD4	
調製濃度	μg/L	0	0.15	0.5	1	5	
実測回数	回	3					
ELISA 実測 (吸光度*)	1	-	1.466	1.118	0.929	0.612	0.211
	2	-	1.356	1.208	0.814	0.618	0.209
	3	-	1.487	1.141	0.870	0.609	0.205

*: ブランクの吸光度を差し引いたもの

採用した回帰式 (Y: 吸光度 X: 濃度(μg/L))

$$Y = (-0.031 - 1.434) / (1 + (X / 0.796)^{-0.894}) + 1.434 \quad R^2 = 0.999$$



Using Standard Data Set from Current Experiment.
 4-parameters: $Y=(A-D)/(1+(X/C)^B)+D$
 20/50/80%: $X = 1.748/0.549/0.131$ $Y = 0.454/0.822/1.191$
 $A=-0.031\pm-0.007$, $B=-0.894\pm-0.016$, $C=0.796\pm-0.016$, $D=1.434\pm-0.008$
 $\chi^2=0.002$, $RMS=0.014$, $r^2=0.999$

図 5.1.4 検量線

この試験における測定データは、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 S1			溶液 S2			溶液 S3			溶液 S4			溶液 S5				
		1 日	2 日	3 日	1 日	2 日	3 日	1 日	2 日	3 日	1 日	2 日	3 日	1 日	2 日	3 日		
調製濃度	μg/L	0			0.15			0.5			1			5				
実測回数	回	3																
E L I S A 実 測	吸光度*	1	-	1.465	1.282	1.535	1.195	1.093	1.183	0.882	0.787	0.908	0.571	0.562	0.614	0.186	0.174	0.205
		2	-	1.492	1.235	1.514	1.257	1.050	1.092	0.893	0.747	0.925	0.606	0.554	0.662	0.191	0.181	0.215
		3	-	1.485	1.423	1.523	1.234	1.116	1.181	0.941	0.798	0.823	0.668	0.519	0.641	0.189	0.166	0.225
		平均	-	1.481	1.313	1.524	1.229	1.086	1.152	0.905	0.777	0.885	0.615	0.545	0.639	0.189	0.174	0.215
	換算値	μg/L	0.005	0.054	-	0.194	0.216	0.243	0.620	0.631	0.590	1.399	1.293	1.221	6.424	6.070	6.985	
標準偏差	μg/L	-			0.025			0.021			0.090			0.461				
変動係数	%	-			11.3			3.5			6.9			7.1				

*：ブランクの吸光度を差し引いたもの

日を変えて 3 回測定した値の標準偏差は 0.021 ~ 0.461 μg/L、変動係数は 3.5 ~ 11.3% であった。

(6) 期間再現性

この試験における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

1回目の検量線用標準液の測定データ及び回帰式：(1)測定範囲のものと同じ。(表 5.1.1)

2回目(1ヶ月後)の検量線用標準液の測定データ及び回帰式：表 5.1.10 及び 図 5.1.5

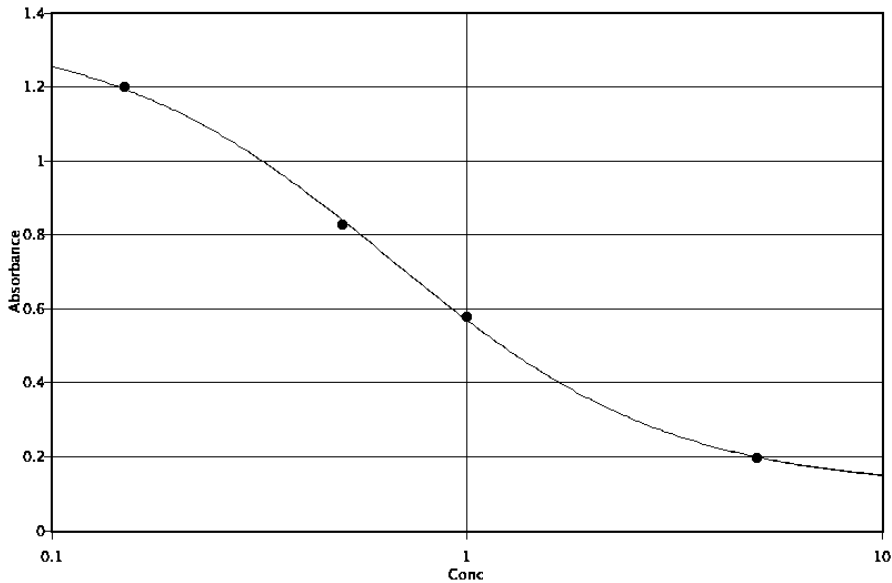
表 5.1.10 検量線用標準溶液の測定データ(2回目)

項目	単位	試験用試料溶液					
		STD0	STD1	STD2	STD3	STD4	
調製濃度	μg/L	0	0.15	0.5	1	5	
実測回数	回	3					
ELISA 実測 (吸光度*)	1	-	1.344	1.220	0.839	0.574	0.203
	2	-	1.384	1.194	0.856	0.599	0.192
	3	-	1.333	1.188	0.792	0.559	0.193

*: ブランクの吸光度を差し引いたもの

採用した回帰式 (Y: 吸光度 X: 濃度(μg/L))

$$Y = (0.112 \quad 1.357) / (1 + (X / 0.653)^{-1.281}) + 1.357 \quad R^2 = 1.000$$



Using Standard Data Set from Current Experiment.
 4-parameters: $Y=(A-D)/(1+(X/C)^B)+D$
 20/50/80%: $X = 1.519/0.591/0.209 \quad Y = 0.428/0.775/1.122$
 $A=0.112\pm0.004, B=-1.281\pm0.018, C=0.653\pm0.007, D=1.357\pm0.005$
 $\chi^2=0.001, RMS=0.009, r^2=1.000$

図 5.1.5 検量線

この試験における測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.11 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回目	2回目	1回目	2回目	1回目	2回目	1回目	2回目	1回目	2回目		
調製濃度	μg/L	0		0.15		0.5		1		5			
実測回数	回	3											
E L I S A 実 測	吸 光 度 *	1	-	1.465	1.367	1.195	1.084	0.882	0.771	0.571	0.519	0.186	0.154
		2	-	1.492	1.276	1.257	1.094	0.893	0.752	0.606	0.579	0.191	0.147
		3	-	1.485	1.300	1.234	1.053	0.941	0.763	0.668	0.533	0.189	0.152
	平均	-	1.481	1.314	1.229	1.077	0.905	0.762	0.615	0.544	0.189	0.151	
換算値	μg/L	0.005	0.048	0.194	0.249	0.620	0.610	1.399	1.072	6.424	9.579		
標準偏差	μg/L	-	-	0.030	0.019	0.056	0.015	0.191	0.091	0.087	0.737		
変動係数	%	-	-	15.4	7.7	9.0	2.4	13.5	8.5	1.4	7.7		
相対値**	%	-	-	129.3	166.0	124.0	122.0	139.9	107.2	128.5	191.6		

*: ブランクの吸光度を差し引いたもの

** 調製濃度を 100%としたときの各実測濃度の割合 (%)

1 回目の測定値（個々の吸光度より求めた換算値）の変動係数は、1.4 ~ 15.4 %、2 回目（一ヵ月後）の測定値の変動係数は、2.4 ~ 8.5 %であった。

(7) プレート間再現性

この試験におけるプレート A 及びプレート C の検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

プレート B の検量線用標準溶液の測定データおよび回帰式は (4) 繰り返し再現性のものに同じ。(表 5.1.6)

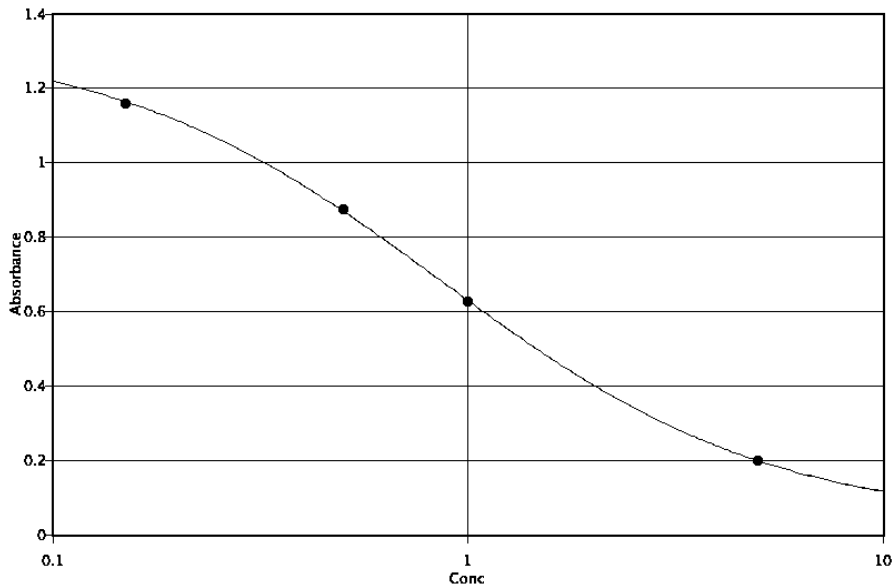
表 5.1.12 検量線用標準溶液の測定データ(プレート A)

項目	単位	試験用試料溶液					
		STD0	STD1	STD2	STD3	STD4	
調製濃度	μg/L	0	0.15	0.5	1	5	
実測回数	回	3					
ELISA 実測 (吸光度*)	1	-	1.295	1.174	0.876	0.633	0.190
	2	-	1.319	1.164	0.909	0.624	0.204
	3	-	1.380	1.140	0.841	0.620	0.201

*: ブランクの吸光度を差し引いたもの

採用した回帰式 (Y: 吸光度 X: 濃度(μg/L))

$$Y = (0.031 - 1.330) / (1 + (X / 0.866)^{-1.092}) + 1.330 \quad R^2 = 1.000$$



Using Standard Data Set from Current Experiment.
 4-parameters: $Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D$
 20/50/80%: $X = 1.854/0.682/0.207$ $Y = 0.425/0.765/1.105$
 $A = 0.031 \pm 0.002$, $B = -1.092 \pm 0.007$, $C = 0.866 \pm 0.005$, $D = 1.330 \pm 0.002$
 $\chi^2 = 0.000$, $RMS = 0.004$, $r^2 = 1.000$

図 5.1.6 検量線

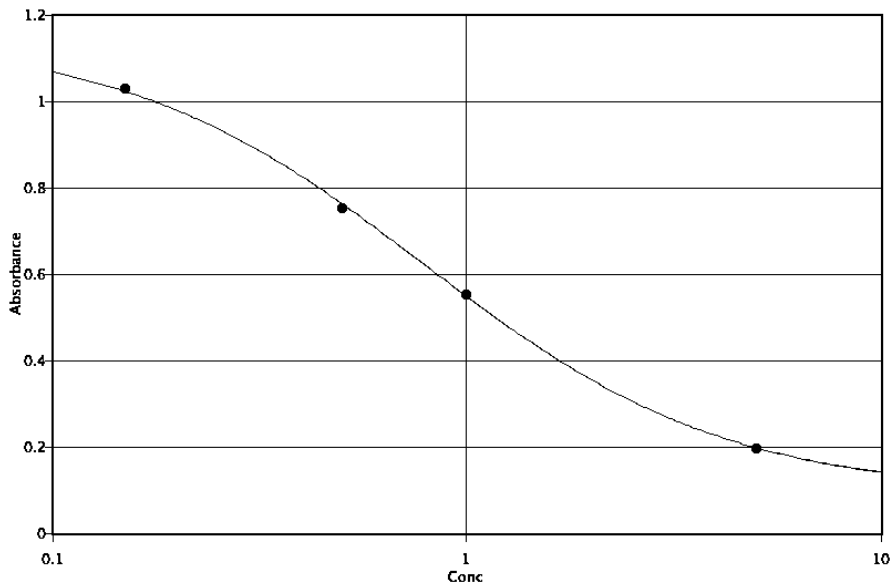
表 5.1.13 検量線用標準溶液の測定データ(プレート C)

項目	単位	試験用試料溶液					
		STD0	STD1	STD2	STD3	STD4	
調製濃度	μg/L	0	0.15	0.5	1	5	
実測回数	回	3					
ELISA 実測 (吸光度*)	1	-	1.166	1.050	0.786	0.553	0.209
	2	-	1.141	1.032	0.724	0.556	0.188
	3	-	1.134	1.002	0.749	0.551	0.189

*:ブランクの吸光度を差し引いたもの

採用した回帰式 (Y: 吸光度 X: 濃度(μg/L))

$$Y = (0.091 - 1.150) / (1 + (X / 0.793)^{-1.192}) + 1.150 \quad R^2 = 1.000$$



Using Standard Data Set from Current Experiment.
 4-parameters: $Y=(A-D)/(1+(X/C)^B)+D$
 20/50/80%: $X = 1.760/0.674/0.225$ $Y = 0.386/0.672/0.957$
 $A=0.091\pm/0.003$, $B=-1.192\pm/0.015$, $C=0.793\pm/0.009$, $D=1.150\pm/0.004$
 $\chi^2=0.001$, $RMS=0.007$, $r^2=1.000$

図 5.1.7 検量線

この試験における測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.14 対象物質試料溶液の測定データ(プレート間再現性)

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	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	プレート A	プレート B	プレート C	
調製濃度	μg/L	0			0.15			0.5			1			5			
実測回数	回	3															
E L I S A 実 測	1	-	1.297	1.311	1.128	1.049	1.138	0.987	0.828	0.754	0.664	0.510	0.545	0.519	0.162	0.173	0.139
	2	-	1.446	1.317	1.091	1.086	1.101	0.936	0.843	0.782	0.660	0.602	0.515	0.493	0.167	0.176	0.178
	3	-	1.204	1.268	1.192	1.143	1.091	0.953	0.858	0.775	0.656	0.548	0.517	0.523	0.165	0.172	0.146
	平均	-	1.316	1.298	1.137	1.093	1.110	0.959	0.843	0.770	0.660	0.553	0.525	0.512	0.165	0.173	0.155
	換算値	μg/L	0.014	0.074	0.019	0.220	0.232	0.223	0.542	0.669	0.698	1.245	1.328	1.123	6.284	7.597	7.912
標準偏差	μg/L	0.033			0.006			0.083			0.103			0.863			
変動係数	%	-			2.8			13.0			8.4			11.9			

* ブランクの吸光度を差し引いたもの

3重測定で求めた換算値の、3つのプレート(CはA、Bとは異ロット)間での標準偏差は0.006~0.863 μg/L、変動係数は2.8~13.0%であった。

(8) 交差反応性

この試験におけるグリホサートの検量線（吸光度曲線）の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.15 グリホサート標準溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液					
		溶液 1	溶液 2	溶液 3	溶液 4	溶液 5	
調製濃度	μg/L	0	0.15	0.5	1	5	
実測回数	回	3					
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.355	1.154	0.785	0.533	0.157
	2	-	1.188	1.042	0.760	0.575	0.165
	3	-	1.400	1.060	0.764	0.530	0.155

*：ブランクの吸光度を差し引いたもの

回帰式 (Y: 吸光度 X: 濃度(μg/L))

$$Y = (-0.008 - 1.315) / (1 + (X / 0.718)^{-0.996}) + 1.315 \quad \dots \text{式 1}$$

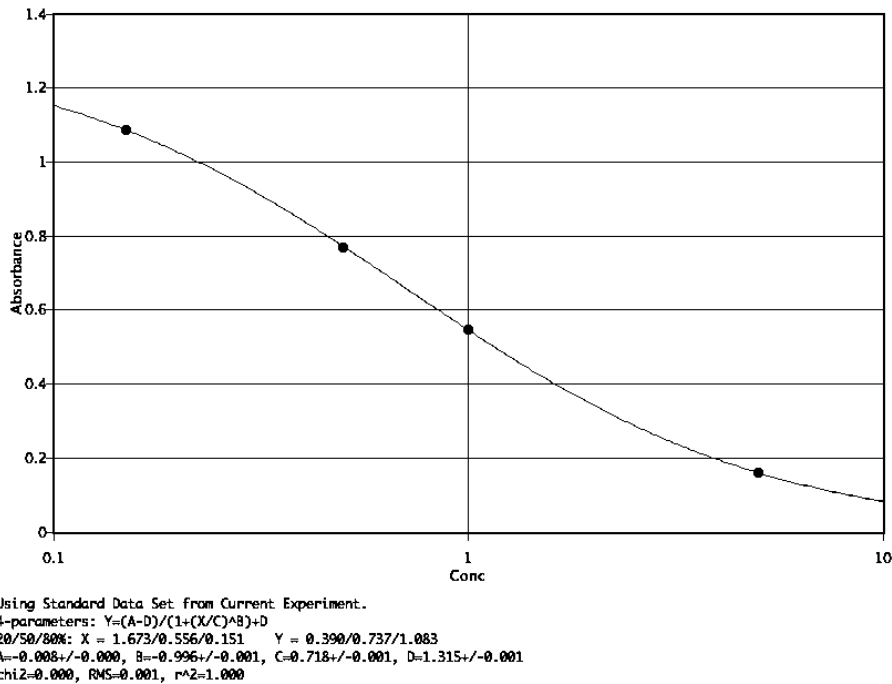


図 5.1.8 グリホサートの吸光度曲線

濃度 0 の時の吸光度は 1.314 であるので、50%発色阻害時の吸光度は 0.657。その時のグリホサートの濃度は、式 1 より、0.710 μg/L。

類似物質：Glyphosine

この試験における Glyphosine の検量線（吸光度曲線）の作成記録は、以下に示すとおりである。

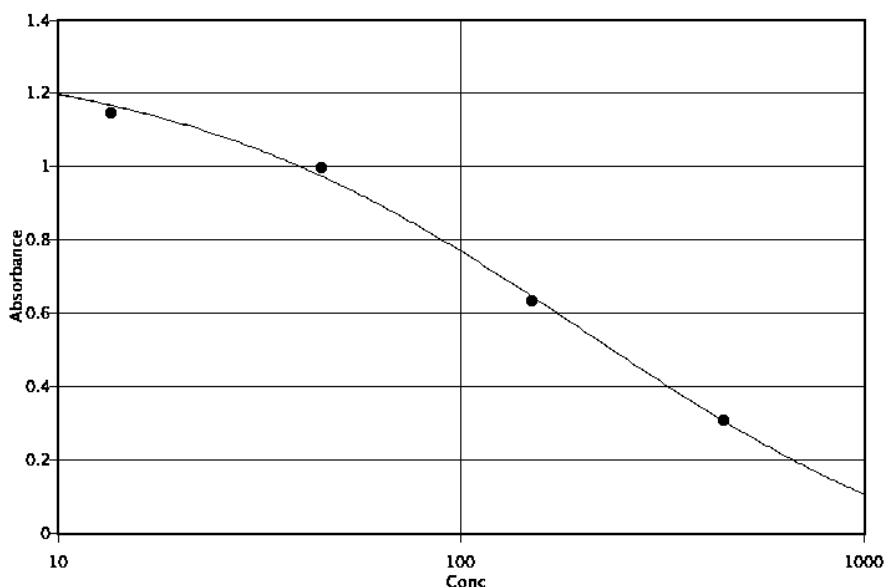
表 5.1.16 Glyphosine の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液					
		溶液 1	溶液 6	溶液 7	溶液 8	溶液 9	
調製濃度	μ g / L	0	13.5	45	150	450	
実測回数	回	3					
ELISA 実測 (吸光度*)	1	-	1.355	1.173	1.054	0.639	0.305
	2	-	1.188	1.169	0.963	0.677	0.315
	3	-	1.400	1.096	0.974	0.582	0.302

*：ブランクの吸光度を差し引いたもの

回帰式（Y：吸光度 X：濃度(μg/L)）

$$Y = (-0.215 - 1.309) / (1 + (X / 204.577)^{-0.836}) + 1.309 \quad \dots \text{式 2}$$



Using Standard Data Set from Current Experiment.
 4-parameters: $Y=(A-D)/(1+(X/C)^B)+D$
 20/50/80%: $X = 230.469/86.113/20.697$ $Y = 0.509/0.811/1.113$
 $A=-0.215+/-0.012$, $B=-0.836+/-0.021$, $C=204.577+/-5.758$, $D=1.309+/-0.010$
 $\chi^2=0.003$, $RMS=0.018$, $r^2=0.998$

図 5.1.9 Glyphosine の吸光度曲線

吸光度 0.657 の時の Glyphosine の濃度は、式 2 より、144.483(μg/L)。

Glyphosine の交差率は、50%発色阻害濃度より、

$$(0.710 / 144.483) * 100 = 0.491 (\%)$$

類似物質: グルフォシネート (Glufosinate ammonium)

この試験における Glufosinate ammonium の検量線 (吸光度曲線) の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.17 Glufosinate ammonium の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液					
		溶液 1	溶液 10	溶液 11	溶液 12	溶液 13	
調製濃度	mg/L	0	500	1000	2500	5000	
実測回数	回	3					
ELISA 実測 (吸光度*)	1	-	1.355	1.314	1.313	1.126	0.992
	2	-	1.188	1.341	1.304	1.072	0.952
	3	-	1.400	1.361	1.367	1.130	1.054

*: ブランクの吸光度を差し引いたもの

当初予定した調製濃度 (最大 350mg/L) ではほとんど発色阻害がみられなかったため、より高濃度の溶液を調製した。しかし、5,000mg/L まで高濃度にしても、50%の発色阻害はみられなかった。調製した濃度系列では吸光度曲線が描けなかったため、交差率の計算には最も高濃度の時の値を用いた。5,000mg/L の時の吸光度 0.999 の発色阻害率は 24%。同じ吸光度の時のグリホサートの濃度は、式 1 より、0.224 µg/L。

Glufosinate ammonium の交差率は、24%発色阻害濃度より、
 $(0.224 / 5,000,000) \times 100 = 0.000004 (\%) (< 0.001 (\%))$

類似物質: AMPA (アミノメチルホスホン酸)

この試験における AMPA の検量線 (吸光度曲線) の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.18 AMPA の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液					
		溶液 1	溶液 10	溶液 11	溶液 12	溶液 13	
調製濃度	mg/L	0	1	5	20	50	
実測回数	回	3					
ELISA 実測 (吸光度*)	1	-	1.355	1.144	0.700	0.367	0.210
	2	-	1.188	1.059	0.636	0.369	0.200
	3	-	1.400	1.099	0.692	0.346	0.211

*: ブランクの吸光度を差し引いたもの

回帰式 (Y: 吸光度 X: 濃度(mg/L))

$$Y = (0.108 - 1.317) / (1 + (X / 4.610)^{-0.968}) + 1.317 \quad \dots \text{式 3}$$

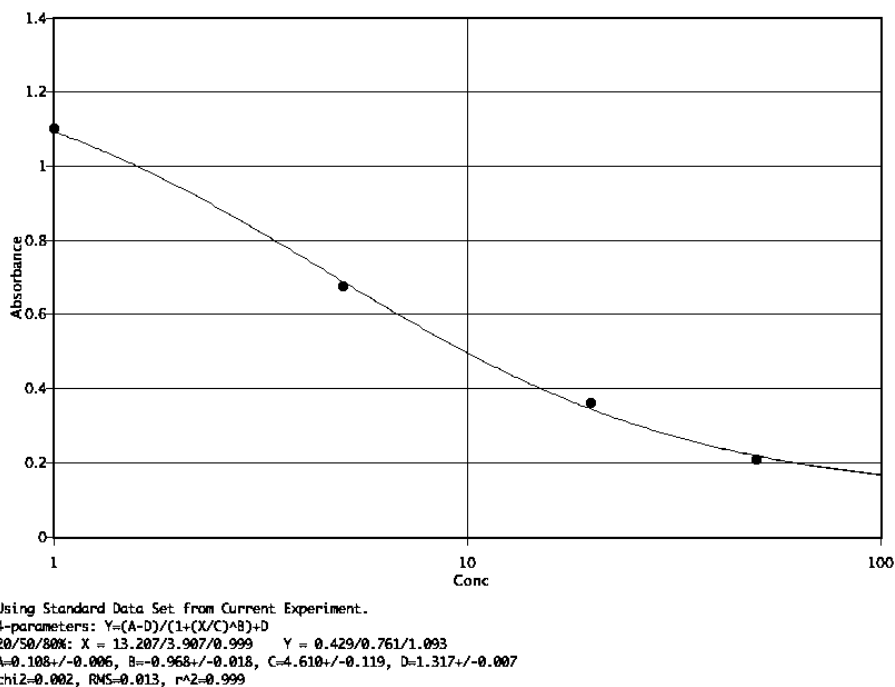


図 5.1.10 AMPA の吸光度曲線

吸光度 0.657 の時の AMPA の濃度は、式 3 より、5.57592mg/L

AMPA の交差率は、50%発色阻害濃度より、

$$(0.710 / 5575.92) \times 100 = 0.0127 (\%)$$

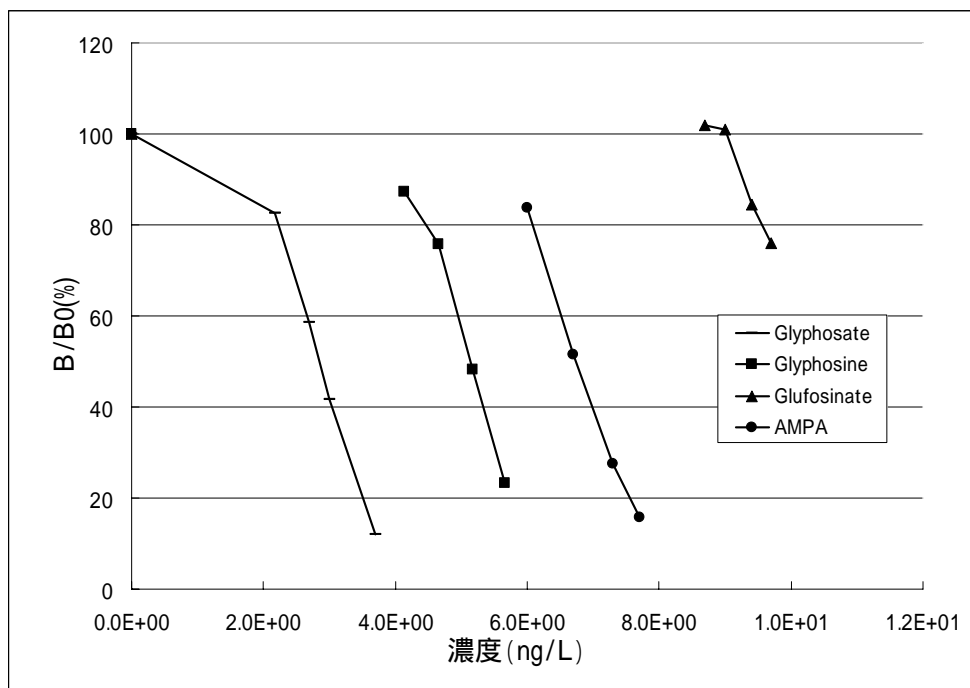


図 5.1.11 各物質の吸光度曲線

5.2 実用的な性能

(1)回収特性

この試験における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

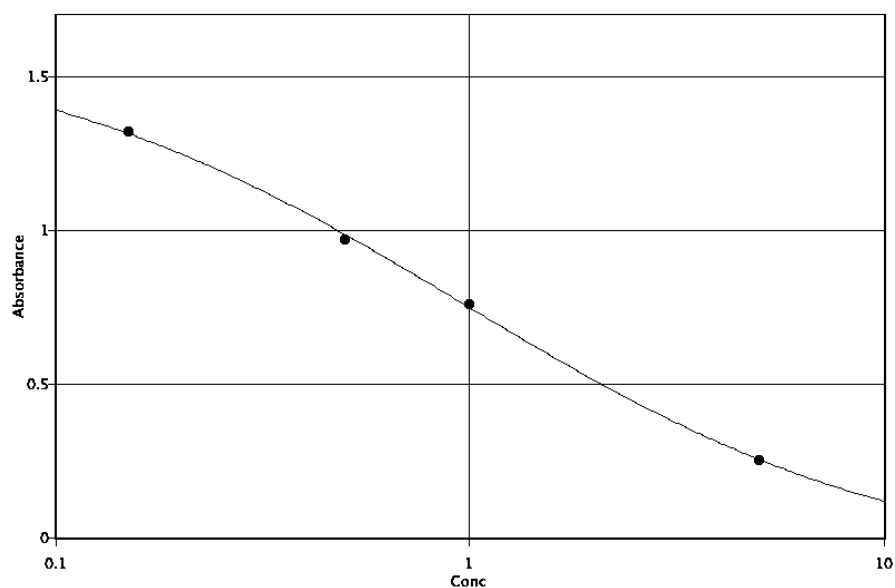
表 5.2.1 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液					
		STD0	STD1	STD2	STD3	STD4	
調製濃度	μg/L	0	0.15	0.5	1	5	
実測回数	回	3					
ELISA 実測 (吸光度*)	1	-	1.692	1.368	0.924	0.738	0.268
	2	-	1.412	1.216	0.970	0.730	0.234
	3	-	1.787	1.376	1.011	0.806	0.250

*:ブランクの吸光度を差し引いたもの

採用した回帰式 (Y: 吸光度 X: 濃度(μg/L))

$$Y = (-0.117 - 1.632) / (1 + (X / 0.969)^{-0.803}) + 1.632 \quad R^2 = 1.000$$



Using Standard Data Set from Current Experiment.
 4-parameters: $Y=(A-D)/(1+(X/C)^B)+D$
 20/50/80%: $X = 1.900/0.571/0.121$ $Y = 0.527/0.941/1.355$
 $A=-0.117+/-0.006$, $B=-0.803+/-0.010$, $C=0.969+/-0.015$, $D=1.632+/-0.006$
 $\chi^2=0.001$, $RMS=0.011$, $r^2=1.000$

図 5.2.1 検量線

この試験における測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.2.2 試料溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液						
		グリホサート 1 μ g/L 添加河川水						
フミン酸 Na 添加濃度	mg/L	0	1	5	10	50		
実測回数	回	3						
ELISA 実測	吸光度	1	-	0.654	0.716	0.622	0.624	0.440
		2	-	0.628	0.603	0.595	0.635	0.450
		3	-	0.627	0.608	0.578	0.510	0.510
		平均	-	0.637	0.643	0.599	0.590	0.467
	換算値	μ g/L	1.371	1.348	1.532	1.572	2.292	
標準偏差	μ g/L	0.060	0.237	0.099	0.348	0.268		
変動係数	%	4.4	17.4	6.5	21.7	11.6		
回収率	%	137.1	134.8	153.2	157.2	229.2		
回収率 2*	%	100.0	98.3	111.7	114.7	167.2		

* フミン酸ナトリウム添加量 0 の時に対する値

フミン酸ナトリウム添加濃度 50mg/L の試料溶液で、明らかに正の妨害が認められた。

(2) 測定精度等

(2) - 1 実試料分析

検量線作成記録

この試験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 5.2.3 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液					
		STD0	STD1	STD2	STD3	STD4	
調製濃度	μg/L	0	0.15	0.5	1	5	
実測回数	回	3					
ELISA 実測 (吸光度*)	1	-	1.324	1.128	0.748	0.602	0.224
	2	-	1.343	1.074	0.798	0.591	0.209
	3	-	1.342	1.090	0.805	0.592	0.204

*: ブランクの吸光度を差し引いたもの

採用した回帰式 (Y: 吸光度 X: 濃度(μg/L))

$$Y = (0.024 \quad 1.337) / (1 + (X / 0.730)^{-0.926}) + 1.337 \quad R^2 = 1.000$$

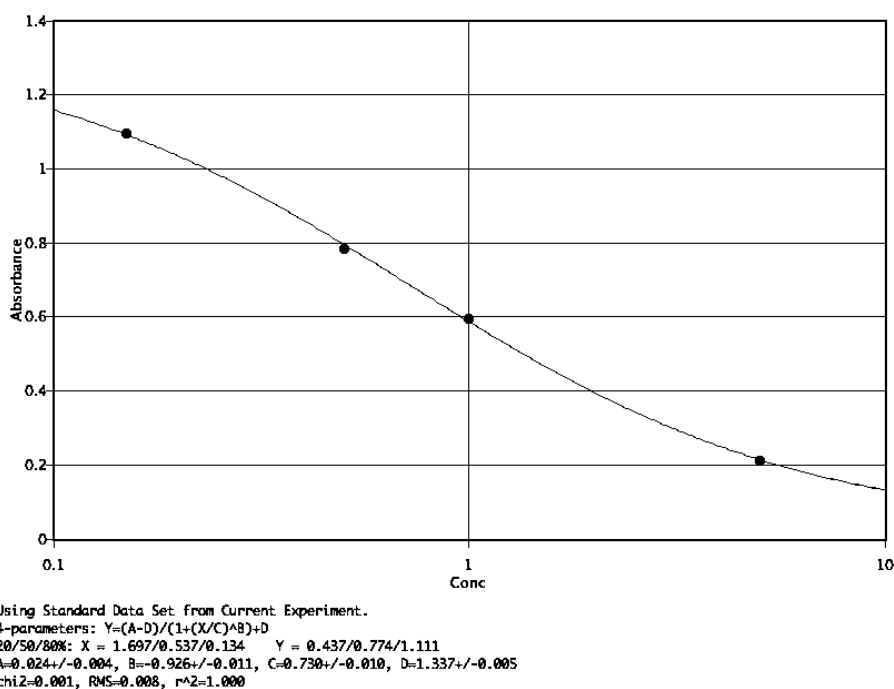


図 5.2.2 検量線

試験結果記録

結果は表 5.2.4 のとおりである。

表 5.2.4 試料溶液の測定データ

項目	ELISA 法				機器分析	
試料番号	吸光度				測定結果 ($\mu\text{g}/\text{l}$)	測定結果 ($\mu\text{g}/\text{l}$)
	1 回目	2 回目	3 回目	平均		
1	1.219	1.340	1.064	1.207	ND(0.067)	0.07
2	1.237	1.236	1.169	1.214	ND(0.063)	0.04
3	1.144	1.214	1.130	1.162	ND(0.097)	0.05
検出下限					0.138	0.014
定量下限					0.459	0.042

(注) ELISA 法の測定結果欄は、いずれも検出下限以下(ND)であるが、計算による値を参考のため()内に示している。

ELISA 法ではいずれも不検出であったが、機器分析ではいずれも若干濃度検出された。

(2) - 2 実試料添加試験

検量線作成記録

この試験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 5.2.5 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液					
		STD0	STD1	STD2	STD3	STD4	
所定濃度	μg/L	0	0.15	0.5	1	5	
実測回数	回	3					
ELISA 実測 (吸光度*)	1	-	1.299	1.056	0.784	0.596	0.211
	2	-	1.298	1.076	0.762	0.594	0.211
	3	-	1.235	0.997	0.737	0.533	0.181

*:ブランクの吸光度を差し引いたもの

採用した回帰式 (Y: 吸光度 X: 濃度(μg/L))

$$Y = (-0.010 - 1.278) / (1 + (X / 0.800)^{-0.888}) + 1.278 \quad R^2 = 1.000$$

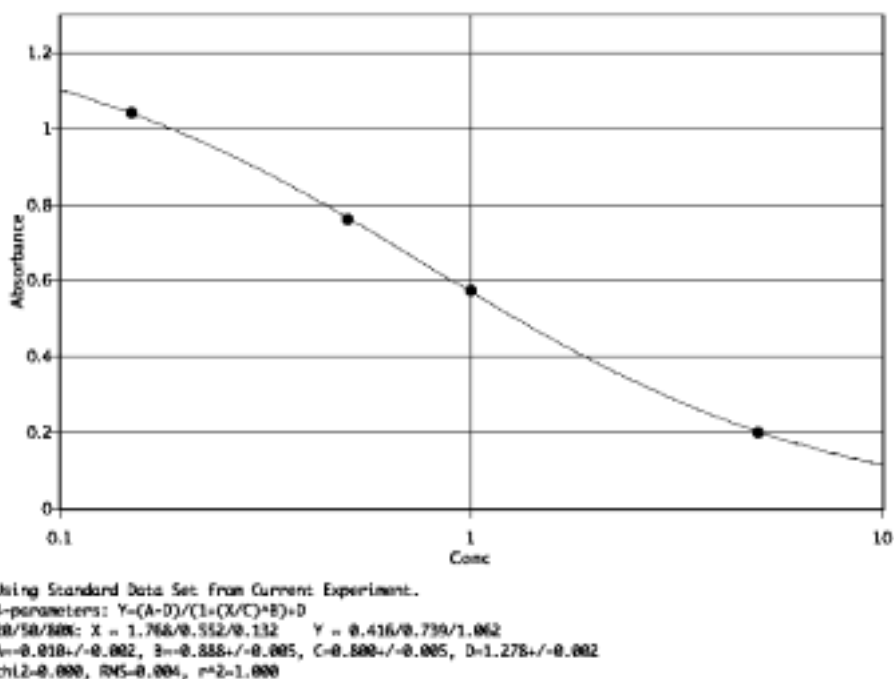


図 5.2.3 検量線

試験結果記録

この試験における測定データは次の表のとおりであった。

表 5.2.6 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	0.15	0.5	1	5		
実測回数	回	3						
ELISA 実測	吸光度	1	-	1.165	0.947	0.735	0.494	0.173
		2	-	1.227	0.976	0.724	0.501	0.171
		3	-	1.111	0.918	0.720	0.514	0.171
		平均	-	1.167	0.947	0.726	0.503	0.171
	換算値	μg/L	0.056	0.242	0.578	1.273	6.126	
標準偏差	μg/L	-	0.032	0.016	0.047	0.051		
変動係数	%	-	13.3	2.8	3.7	0.8		
相対値**	%	-	161.3	115.6	127.3	122.5		

* ブランクの吸光度を差し引いたもの ** 調製濃度を 100%としたときの各実測濃度の割合 (%)

低濃度 (0.15 μg/L) で若干高めの値であったが、概ね良好な測定結果であり、環境調査にも適用可能と考えられる。

6. 実証試験結果の検討と考察

(1) 製品性能の信頼性

基本的な性能の、「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」における測定値（濃度）のばらつきに関しては妥当であった。

なお、測定値が調製濃度より常に高い値を示す傾向があり、たとえば、測定範囲の中央付近の $1 \mu\text{g/L}$ に調製した試験試料の測定値の平均値は $1.208 \mu\text{g/L}$ であった。試験に用いたグリホサート標準品とキット添付の標準液とは別のメーカーのものであったので、キット添付の標準液と同じメーカーのグリホサート標準品を入手して同様に測定を行ってみたが、 $1 \mu\text{g/L}$ に調製した試験試料の測定値は $1.158 \mu\text{g/L}$ となり、調製濃度よりも高い値を示した。

基本的な性能の「検出下限及び定量下限」では、下限付近の測定値より求めた検出下限は $0.138 \mu\text{g/L}$ 、定量下限は $0.459 \mu\text{g/L}$ 、0 濃度の測定値より求めた検出下限は $0.122 \mu\text{g/L}$ で、製品データにある検出限界（検出下限） $0.1 \mu\text{g/L}$ ・定量下限 $0.15 \mu\text{g/L}$ よりも高い値であった。

基本的な性能の「交差反応性」では、Glyphosine、Glufosinate ammonium、AMPA は、いずれも 0.5%未満で低い交差率であった。

実用的な性能の「回収率」では、フミン酸ナトリウムの濃度が高い試験液は測定値が高くなったが、通常の河川水程度では影響は少ないと思われる。

(2) 一般環境モニタリングでの実用性

環境試料として河川水にグリホサートを添加した実証試験の結果から、 $0.5 \mu\text{g/L}$ 以上の濃度であれば、水質モニタリング等の実用化が可能である。

(3) 製品操作等の簡便性

一般環境モニタリングでの使用を想定した場合、誘導体化の操作を含め、約 3 時間で測定結果を得ることができる。また、同時に約 25 試料(3重測定)の測定が可能である。

なお、本試験での蛍光誘導体化・HPLC 法では、試料の測定に最低 1 日が必要である。

付録： 実証試験計画書

(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	日本エンバイロケミカルズ株式会社
技術・製品の名称	《技術名》ELISA法（酵素免疫測定法） 《製品名》グリホサートELISAキット （マイクロプレート）

平成17年10月

山 口 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)

山口県環境保健研究センター

所長 宮村 恵宣

(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

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	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
検出下限及び定量下限試験	11
繰返し再現性試験	11
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
7 . 監査	14
8 . 評価	14

資料

技術の先進性、その他

環境技術開発者による性能試験結果

使用説明書

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。

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	山口県環境保健研究センター
	住所	〒753-0871 山口市朝田5 3 5
	担当者所属・氏名	企画情報室 室長 古谷 長藏
	電話番号	083-924-3670
	FAX 番号	083-924-3673
	E-mail アドレス	furutani.chozo@pref.yamaguchi.lg.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 東京都港区芝浦一丁目2番1号 シーバンスN館9階
	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。

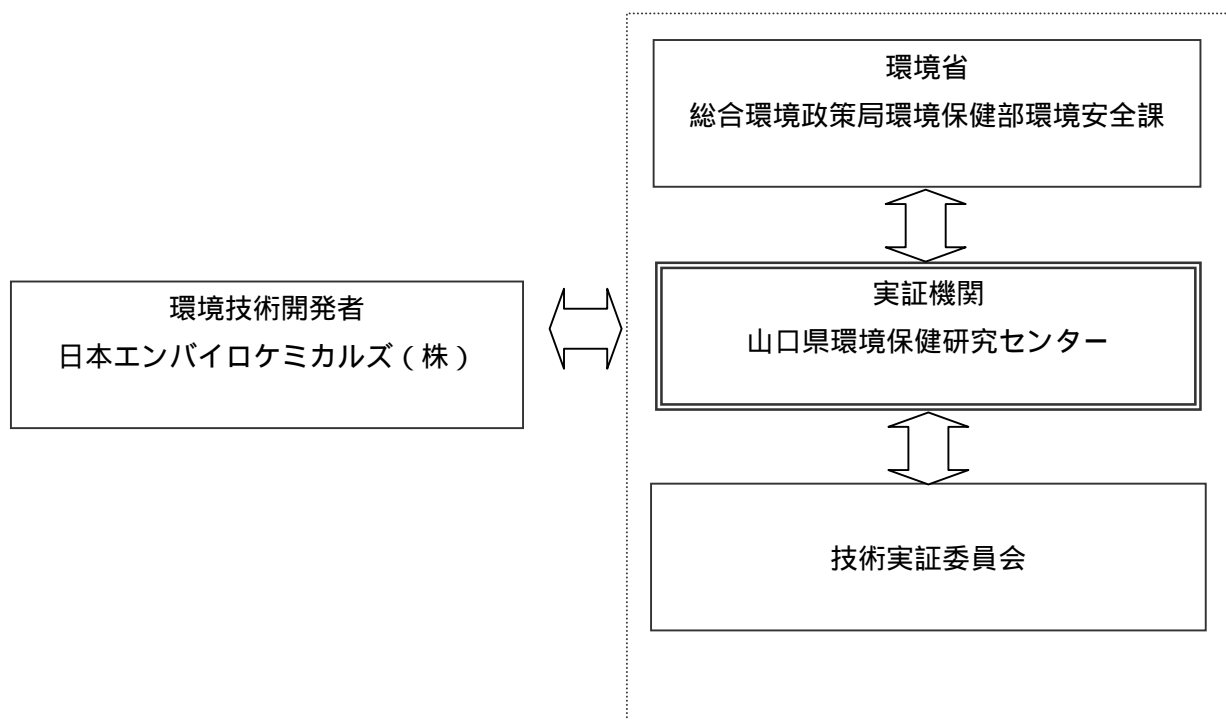


図 2.2 実証試験の実施体制

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	技術次長	松村 健道
	実証試験における ELISA 法の総括責任者	生物学部長	吉川 正俊
	実証試験における ELISA 法担当者のリーダー	専門研究員	數田 行雄
	実証試験における ELISA 法担当者	専門研究員	吹屋 貞子
	実証試験における ELISA 法担当者	研究員	村田 加奈子
	実証試験における機器分析の総括責任者	水質部長	手島 義人
	実証試験における機器分析担当者のリーダー	主任	田中 克正
	実証試験における機器分析担当者	専門研究員	下濃 義弘
	実証試験における機器分析担当者	研究員	古谷 典子
	実証試験における機器分析担当者	研究員	下尾 和歌子
	実証試験における精度管理の総括責任者	企画情報室 室長	古谷 長蔵
	実証試験における精度管理担当者	専門研究員	河村 章
	実証試験における精度管理担当者	大気部主任	杉山 邦義
	実証試験における精度管理担当者	理化学部 専門研究員	立野 幸治
	実証試験品質管理責任者	企画情報室 室長	古谷 長蔵
環境技術開発者	実証対象製品の提供	事業開発室 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 リサーチマネージャー	藤本 茂
	実証試験実施上の参考情報の提供	研究開発部 リサーチマネージャー	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、グリホサートに対する特異的な抗体を応用した環境試料（水質、底質、生物）中のグリホサート測定 ELISA キットである。

ELISA の原理は、競合反応（グリホサート濃度が高い試料では吸光度が低く、グリホサート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	グリホサート ELISA キット（マイクロプレート）
型番	《販売元コード》未定（製造元コード：PN 500086）
販売・製造元	《販売》和光純薬工業（株）《輸入》日本エンバイロケミカルズ（株） 《製造》Abraxis LLC（米国）
重量（キット一式、g）	845g
価格（円）	要照会
分析対象物質	グリホサート
対象環境媒体	水質・底質・生物・その他（穀物） 水試料以外は抽出操作が必要。
利用用途	環境水（地下水、表流水、飲料水）のモニタリング
標準試薬・種類	付属（調製済 / 調製要） グリホサート 0, 0.15, 0.5, 1.0, 5.0ppb 各水溶液
操作環境（室温）	10 ~ 30
製品保管条件	2 ~ 8
製品保証期間	製造後 12 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 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	0.15 ~ 5 µg/L (添付資料 : GLY-MP-1)
検出下限及び定量下限	検出限界 : 0.1 µg/L 定量下限 : 0.15 µg/L
繰返し再現性	標準偏差 : 0.151 変動係数 : 10.9%
日間再現性	標準偏差 : 0.063 変動係数 : 8.2%
期間再現性	標準偏差 : 0.091 変動係数 : 11.8%
プレート間再現性	標準偏差 : 0.33 変動係数 : 11.7%
交差反応性	類縁体等との交差反応性 (添付資料 : GLY-MP-2)
その他	
2. 実用的な性能	
回収特性	5 箇所から採取した環境水への添加回収実験結果 (添付資料 : GLY-MP-3)
測定精度等	機器分析 (ポストカラム誘導体化 HPLC 法) との比較 : R=0.895 (対環境水)
その他	
試験責任者	Barbara Hughes (QA Manager)
試験年月日	平成 17 年 8 月 20 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～平成 18 年 1 月とする。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）

	10月	11月			12月	1月	2月
		上旬	中旬	下旬			
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 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 ELISA 法（グリホサート）」の試験操作手順に従って行う。

イ．検量線作成用標準溶液

キットに付属する標準物質の希釈濃度系列（以下、指定濃度系列：調製済）を使用する。

ウ．吸光度の測定

吸光度は、マイクロプレートリーダー（バイオ・ラッド社製マイクロプレートリーダーモデル 680XR）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

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。

（検量線作成用の解析ソフト：バイオ・ラッド社製マイクロプレートマネージャー）

オ．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

グリホサートの市販標準物質を用いて、蒸留水を希釈溶媒として、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	グリホサート	0, 0.15, 0.5, 1.0, 5 µg/L
測定範囲 日間再現性 期間再現性 プレート間再現性	グリホサート	0, 0.15, 0.5, 1.0, 5 µg/L
検出下限及び定量下限	グリホサート	0.15 µg/L
繰返し再現性	グリホサート	1.0 µg/L
交差反応性	Glyphosine	0, 0.45, 1.5, 3, 15mg/L
	Glufosinate	0, 10.5, 35, 70, 350mg/L
	AMPA	0, 20, 100, 500, 1,000mg/L

測定範囲試験

各試験用試料溶液につき 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繰返し測定（3 重測定 8 回）し、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。

更に、0 濃度で吸光度を 10 回測定して標準偏差(SD)を求め、平均吸光度から 3SD を差し引いた吸光度に相当する濃度を検出下限とし、申請データと比較検討する。

繰返し再現性試験

測定範囲の中央付近に調製した試料溶液を 3 重測定で 8 回測定し、得られた実測濃度よ

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「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

同一ロットの2プレートを用いて、1ヶ月以上離れた時期に「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「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

グリホサート及び類似物質(Glyphosine, Glufosinate, AMPA)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。(グリホサートの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、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 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市販標準物質（グリホサート）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、標準偏差、変動係数、回収率を求め、フミン酸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：グリホサート	1.0 μg/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、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。

資料

技術の先進性、その他

環境技術開発者による性能試験結果

使用説明書

グリホサート物性表

資料

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ください。

技術の先進性

抗原抗体反応を応用した本技術は、迅速で経済的なオンサイトでの半定量キットとして、あるいはラボでの精密な定量キットとして使い分けることができる。

この技術は簡便な前処理で多数のサンプルを同時に測定でき、有害な有機溶媒も使用しない。

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。

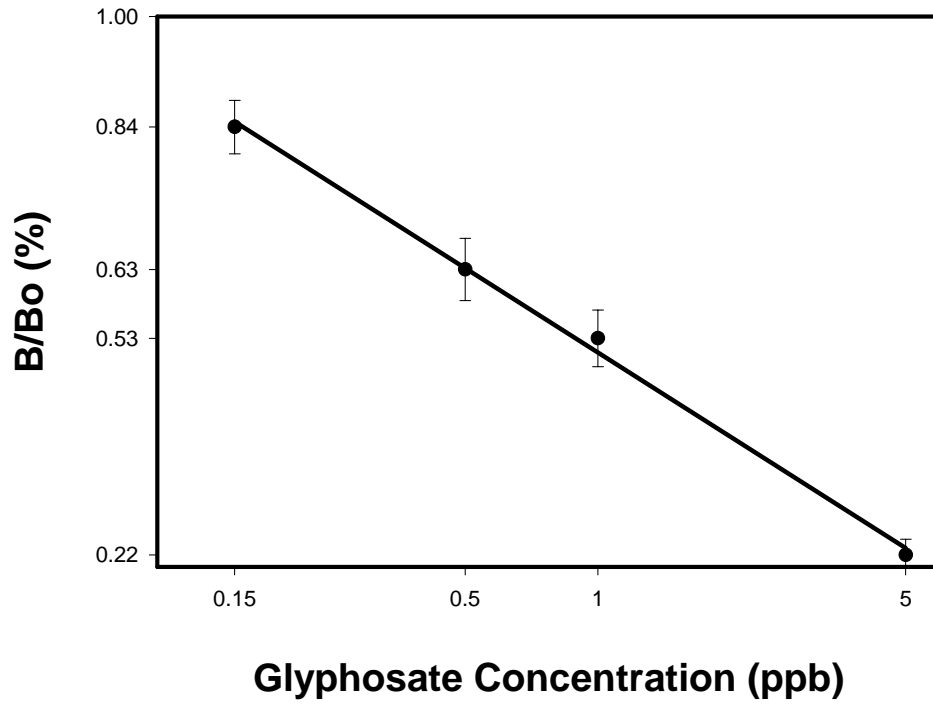
今後の取り組み

・生体試料（血清）への適用を検討中。

資料

添付資料 GLY-MP-1

1- 測定範囲



定量範囲 : 0.15 ~ 5 μ g/L

添付資料 GLY-MP-2

1- 交差反応性

(B/B₀=90%から算出した検出下限および阻害率 50%となるのに必要な濃度の 2 通りで表現しています。)

化合物	LDD (ppb)	50% B/B ₀ (ppb)
Glyphosate	0.10	1.0
Glyphosine	50	3,000
Glufosinate	2000	70,000
AMPA	35,000	>1,000,000
Glycine	>10,000	>1,000,000

添付資料 GLY-MP-3

2- 回収特性

(5 箇所から採取した環境水に数段階濃度のグリホサートをスパイクした添加回収実験の結果は以下の通りです。)

Glyphosate 添加量(ppb)	回収実験		
	平均値(ppb)	標準偏差(ppb)	回収率(%)
0.25	0.25	0.05	102
0.5	0.53	0.05	105
1.0	1.03	0.14	103
2.0	2.12	0.16	106
Average			104

グリホサート ELISA キット (マイクロプレート) ・使用説明書

●使用目的

各種環境水(地下水、表流水、井戸水、など)中のグリホサートの検出や定量に使用できます。土壌、穀物、食品の分析方法についてはお問い合わせください。

●測定原理など

グリホサート ELISA キット (マイクロプレート)は酵素免疫測定法(ELISA)を原理としたグリホサート分析キットです。試料中のグリホサートを(キット添付の試薬で)誘導体化後、グリホサート抗体とともに一次抗体固相化プレートに添加し、30 分間の抗原抗体反応を行います。次に抗原酵素複合体溶液を加え、60 分間の競争反応を行い、洗浄操作の後に発色液を加え発色(ブルー色)させます。

試料中のグリホサートは、結果的に酵素基質(過酸化水素)と水素供与体(3',3,5,5'-テトラメチルベンチジン)からなる発色液(Color Solution)により検出されます。(グリホサート抗体に結合した抗原酵素複合体が発色液を着色させます。)一定の発色反応時間の後に発色停止液(Stopping Solution)の添加により発色反応を止め、着色を安定化させます。この発色に寄与する抗原酵素複合体は、試料中の抗原(グリホサート)との競争反応のすえ抗体に結合したもので、着色度は試料中のグリホサート濃度に反比例する結果となります。

●試薬

グリホサート ELISA キット (マイクロプレート)には以下の試薬が含まれています。

一次抗体抗体固相化プレート(Microtiter Plate coated with Goat-Anti Rabbit Antibody)

96 テスト: 8×12 ストリップ

抗グリホサート抗体溶液(Glyphosate Antibody Solution)

抗グリホサート抗体(ウサギ)溶解液(ベース:防腐剤と安定剤を含有した緩衝溶液 96 回テスト分:6mL)

抗原酵素複合体溶液(Glyphosate Enzyme Conjugate)

西洋ワサビペルオキシターゼ溶液(ベース:防腐剤と安定剤を含有した緩衝溶液)

96 回テスト分:6mL

グリホサート標準液(Glyphosate Standards)

標準液 0, 0.15, 0.5, 1.0, 5.0ppb 溶液(ベース:防腐剤と安定剤を含有した蒸留水)

96 回テスト分:各 2mL

コントロール(Control)

グリホサート 0.75ppb 溶液(ベース:防腐剤と安定剤を含有した蒸留水)

96 テスト分:2mL

希釈液/ゼロ標準液(試料希釈液)(Diluent/Zero Standard (Sample Diluent))

グリホサートや抗体への交差反応物質を含まない防腐剤と安定剤を含有した蒸留水

96 テスト分:30mL

発色液(Color Solution)

過酸化水素と 3',3,5,5'-テトラメチルベンチジン溶液(ベース:有機溶剤)

96 テスト分:16mL

発色停止液(Stopping Solution)

希硫酸

96 テスト分:16mL

洗浄濃縮液・5倍濃縮液(Washing Buffer 5X Concentrate)

緩衝塩溶液(ベース:洗浄剤と安定剤を含有した蒸留水)

96 テスト分:100mL

測定用緩衝液(Assay Buffer)

緩衝塩溶解液

96 テスト分:125mL

誘導化試薬(Derivatization Reagent)

96 テスト分:100 μL(3 本)

誘導化試薬希釈液(Derivatization Reagent Diluent)

ジメチルスルホキシド(DMSO)

96 テスト分:4mL(3 本)

●試薬の保存と安定性

全ての試薬を 2-8℃ で保存してください(冷凍厳禁)。試薬はキット箱記載の使用期限までにご使用ください。誘導化試薬は、測定を行う日に溶解液を必要分だけ調整し、ご使用ください。洗浄液は特に冷蔵保存する必要はありませんので、冷蔵庫スペースを有効利用するため、別の場所に保存いただいても結構です。

試薬の廃棄については、所定の法定規則に従ってください。

●必要な器具や試薬(キットに含まれないもの)

キットに含まれる試薬以外に、以下の器具や試薬が必要になります。

- ・マイクロピペット(50, 100, 150, 250 μ L が秤量可能なもの)
- ・マルチチャンネルピペット(50, 100, 150, 250 μ L が秤量可能なもの)
- ・使い捨てピペット(5mL が計量可能なもの)
- ・パラフィルム
- ・使い捨て試験管
- ・蒸留水(ミリQ水)
- ・ボルテックスミキサー
- ・プレートリーダー(450nm 読み取り可能なもの)
詳しくはお問い合わせください。

●測定試料について

ここで紹介するのは水試料に対する使用方法です。その他の試料については使用方法の変更やバリデーションが必要になります。

ss 分を含む試料はろ過してください。(ろ材の一例; 0.2 μ m Anotop™ 25 Plus, Whatman, Inc.)

モノクロロ酢酸や他の酸で保存されている試料は 6N 水酸化ナトリウム等の強塩基で中和してください。

試料中のグリホサート濃度が 5ppb 以上の場合は試料を希釈して再測定してください。この場合、キット添付の 希釈液 / ゼロ標準液(試料希釈液)(Diluent/Zero Standard (Sample Diluent)) で 10 倍またはそれ以上の希釈を推奨します。(例えば、別の試験管に 900 μ L の希釈液を取り、そこに 100 μ L の試料を添加し、完全に混合してください。測定方法に従い測定し、得られた結果を希釈倍率で掛け戻してください。)

以下の物質が 1%以上試料中に混在しても、測定結果に影響を与えません。

窒素、リン、硫黄、フッ素、カリウム、マグネシウム、銅、亜鉛、鉄、ナトリウム

マンガンは 100ppm、フミン酸は 10ppm、塩化ナトリウムは 1M まで影響を受けません。

溶剤について、土壌や植物試料の抽出によく使用するメタノールやアセトンは、それら 100%の試料も測定可能です。(但し、この場合、標準液も同じ系にする必要があります。)

●試薬の調製

全ての試薬を使用前に室温にもどしてください。

洗淨液

1000mL の容器で 洗淨濃縮液(Washing Buffer 5X Concentrate)を蒸留水で 5 倍に希釈します。(例えば、100mL の洗淨濃縮液を 400mL の蒸留水で希釈します。)

標準液、コントロール、試料の誘導体化

1. 誘導化試薬(Derivatization Reagent)を 3.5mL の 誘導体化試薬希釈液(Derivatization Reagent Diluent)で希釈します。(溶解液はその日のうちに使い切ってください。)混合は完全に行ってください。
2. 使い捨ての試験管に標準液、コントロール、試料名を印字してください。
3. 250 μ L の グリホサート標準液(Glyphosate Standards)、 コントロール(Control)、試料をそれぞれ 3 で印字した試験管に入れてください。
4. 1.0 mL の 測定用緩衝液(Assay Buffer)を 3.の各試験管に入れ、ボルテックスミキサーで攪拌してください。
5. 1.で作成した誘導体化試薬希釈液 100 μ L を 4.の各試験管に加え、直ぐにボルテックスミキサーで攪拌してください。(この操作は誘導体化試薬希釈液添加後直ぐに行ってください。)
6. 10 分間室温で放置(誘導体化反応)してください。
7. 後述の測定方法に従い、ELISA による測定を行ってください。

●ご使用に関する注意等

イムノアッセイでは一定した測定手技が求められます。測定精度を確保するためにどの試験管やプレートウェルに対してもできるだけ同じ操作・要領で取り扱ってください。他のイムノアッセイ同様、全く同じ操作を行ってください。

ピペットの先端が他の試薬に触れないよう注意しながら、ウェルや試験管の底に直接添加してください。

試薬相互のコンタミや直前に使用した試薬の混入を防ぐため、各試料の添加にはそれぞれ新しいピペットチップを使用し、先に入れた試薬の液滴がピペットの先端に接触しないよう注意してください。

ボルテックスミキサーでの攪拌時に気泡が生じないように注意してください。

マイクロプレートは8ストリップ、12ウェル構成となっており、使用しないストリップは取り外して再シール可能な袋に入れ(乾燥剤とともに)冷蔵保存してください。

3ストリップ以上を1回の測定に使用する場合は、マルチチャンネルピペットのご使用を推奨します。

使用期限を過ぎた試薬を使用しないでください。

24時間以上経過した誘導化試薬溶液は使用しないでください。

発色停止液(Stopping Solution)(希硫酸)の皮膚や粘膜への接触は避けてください。もし発色停止液(が皮膚に接触した場合は水で洗い流してください。

●測定値の取り扱い

グリホサート ELISA キット(マイクロプレート)はグリホサートを検出しますが、関連物質等が試料中に含まれる場合は、その交差反応性等に留意してください。本 ELISA キットによる測定結果はスクリーニングとして有効ですが、数値の絶対値を保障するものではありませんので、(使用目的にもよりますが)陽性となった試料は他の分析方法(GC、HPLC等)で確認する必要があります。

●精度管理

このキットには濃度既知(0.75ppb)のコントロールが添付されています。測定時にコントロールも加え、測定値のずれを精度管理に利用することができます。

●使用方法

試薬の調製やご使用に関する注意等をよくお読みください。

St 0-St 4: Standards 標準液

C: Control sample コントロール

S1-Sx: Samples 試料

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	標準液	標準液	標準液	標準液	標準液	標準液	標準液	標準液	標準液	標準液	標準液	標準液
B	標準液	標準液	標準液	標準液	標準液	標準液	標準液	標準液	標準液	標準液	標準液	標準液
C	標準液	標準液										
D												
E												
F												
G												
H												

1. 50 μ L の 抗グリホサート抗体溶液(Glyphosate Antibody Solution)を各ウェルに入れてください。

2. 50 μ L の誘導体化した標準液、コントロール、試料(試薬の調製欄参照)をウェルに入れてください。分析精度向上のため、二重、三重測定を推奨します(例、上記プレートレイアウト)。ウェルをパラフィルムやプレートシール等で覆い、テーブル上で円運動を描く形でウェル内容物を攪拌します。内容物がこぼれたり跳ねないように注意してください。攪拌後、室温で30分放置(反応)させてください。

3. プレートのカバーを取り、50 μ L の 抗原酵素複合体溶液(Glyphosate Enzyme Conjugate)を連続的に各ウェルに加えます。ウェルをパラフィルムやプレートシール等で覆い、テーブル上で円運動を描く形でウェル内容物を攪拌します。内容物がこぼれたり跳ねないように注意してください。攪拌後、室温で60分放置(反応)させてください。

4. プレートのカバーを取り、勢いよくウェル内容物をトレイなどに捨ててください。洗浄液(試薬の調製欄参照)250 μ L を各ウェルに加え、同様の操作で3回洗浄してください。タッピングや乾いた布等で注意深く吸い取るなどして、ウェル内には液が極力残らないようにしてください。

5. 150 μ L の 発色液(Color Solution)を連続的に各ウェルに入れて、20-30分放置して(反応させて)ください。

6. 100 μ L の 発色停止液(Stopping Solution)を連続的に各ウェルに入れてください。

7. 発色停止液を入れてから15分以内にプレートリーダーで吸光度(450 nm)を測定してください。

●測定結果の算出方法

手計算

1. 各標準液の吸光度の平均値を計算してください。
2. ゼロ標準の平均吸光度で各平均吸光度を割った値(B/B_0)を計算してください。
3. キット添付の片対数グラフに B/B_0 (Y軸:リニア)と各標準液濃度(X軸:対数)をプロットし、検量線を作成してください。
4. コントロールと試料の B/B_0 を検量線に参照して各濃度を読み取ってください。

注意:計算値として0.1ppb以下が得られた結果は定量下限以下と見なしてください。

●機器分析との相関性

採取箇所の異なる環境水試料を測定し、グリホサート ELISA キット (マイクロプレート) による測定値と他の分析機器による結果が良く相関することを確認しています。

●性能試験データ (Abraxis 社実施例)

精度

以下の結果が得られています。

Control	1	2	3	4
Replicates	5	5	5	5
Days	3	3	3	3
n	15	15	15	15
Mean (ppb)	0.41	0.77	1.54	2.81
% CV (within assay)	12.2	8.2	4.1	5.5
% CV (between assay)	16.9	11.8	8.0	11.7

感度

グリホサート ELISA キット (マイクロプレート) の検出下限は 0.1ppb です (B/B₀=90%で算出)。

添加回収

5 箇所から採取した環境水に数段階濃度のグリホサートをスパイクした添加回収実験の結果は以下の通りです。

Amount of Glyphosate Added (ppb)	-----Recovery -----		
	Mean (ppb)	S.D. (ppb)	%
0.25	0.25	0.05	102
0.5	0.53	0.05	105
1.0	1.03	0.14	103
2.0	2.12	0.16	106
Average			104

特異性 (交差反応性)

グリホサート ELISA キット (マイクロプレート) の関連物質に対する交差反応性は以下の通りです。(B/B₀=90%から算出した検出下限および阻害率 50%となるのに必要な濃度の 2 通りで表現しています。)

	LDD	50% B/B ₀ Compound (ppb)	(ppb)
Glyphosate	0.10	1.0	
Glyphosine	50	3,000	
Glufosinate	2000	70,000	
AMPA	35,000	>1,000,000	
Glycine	>10,000	>1,000,000	

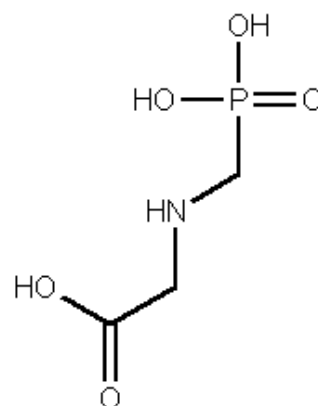
以下の化合物が試料中に 1000ppb 存在しても本 ELISA キットに反応しないことを確認しています。

aldicarb, aldicarb sulfoxide, aldicarb sulfone, acetochlor, alachlor, atrazine, ametryn, benomyl, butylate, captan, carbaryl, carbendazim, carbofuran, cyanazine, 2,4-D, 1,3-dichloropropene, dinoseb, MCPA, metolachlor, metribuzin, pentachlorophenol, picloram, propazine, simazine, terbufos, thiabendazole, and thiophanate-methyl.

●お問合せ

日本エンバイロケミカルズ(株) 事業開発室
 〒105-0023
 東京都港区芝浦一丁目 2 番 1 号 シーバンス N 館 9F
 TEL: 03-5444-9891 FAX: 03-5444-9860
 E-mail: eco@jechem.co.jp
 URL: http://www.jechem.co.jp

資料 グリホサート物性表

実証機関	山口県	環境技術開発者	日本エンバイロケミカルズ(株)
製品の名称	グリホサート ELISA キット (マイクロプレート)		
測定対象物質名	グリホサート		
化学名	N-(phosphonomethyl)glycine-2-propylamine		
分子式(分子量)	C ₃ H ₈ N O ₅ P (169.07)	CAS No.	1071 83 6
構造式			
物理化学的性状	外 観	白色結晶固体	
	融 点	200 ~ 230	
	蒸 気 圧	0.04 mPa (25) * *	
	比 重	-	
	log P _{ow}	- 1.16 *	
	溶 解 性 (g/L, 20)	水: 12 * * 有機溶媒(エタノール、アセトン、ベンゼン)に不溶 *	
	安 定 性	酸、アルカリに安定 光、熱に対して安定	
用 途	含りんアミノ酸系除草剤 * (農業、非農業用の非選択性除草剤)		
備 考	アミノメチルりん酸 (Aminomethylphosphonic acid, AMPA) (グリホサート代謝物) CH ₆ NO ₃ P (111.04) CAS : 1066-51-9		
出 典	国立環境研究所化学物質データベース WebKis - plus * : 農薬ハンドブック ((社)日本植物防疫協会) * * : 上水試験方法・解説 (日本水道協会)		

