

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:ELISA法(酵素免疫測定法) 製品の名称:高感度フェニトロチオン測定キット

平成17年3月

愛知県

はじめに

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

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

(実証項目)

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

本報告書は、その結果を取りまとめたものである。

(実証機関)

愛知県環境調査センター

所長 近藤 徳雄

(要 約)

製品名称	高感度フェニトロチオン測定キット
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	愛知県
対象物質	フェニトロチオン
実証試験の実施期間	平成 16 年 12 月 13 日～平成 17 年 1 月 18 日

1．実証対象技術の概要

この実証対象製品は、申請者が開発したフェニトロチオン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、農産物中の高感度フェニトロチオン測定 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。

2．実証試験の概要

実証試験項目の内容は、次のとおりである。

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

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

3. 実証対象製品のデータ

環境技術開発者より提出された実証対象製品のデータは、次のとおりである。

項目	記入欄
製品名	高感度フェニトロチオン測定キット
型番	EL207-00
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	フェニトロチオン
対象環境媒体	水質・底質・生物・その他(農産物)
利用用途	残留農薬測定、環境水モニタリング
標準試薬・種類	付属(調製済/調製要)
操作環境(室温)	室温
製品保管条件	8以下
製品保証期間	製造後6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(固相抽出等の前処理時間を除く)

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

4. 実証試験結果の概要

項目	結果概要	
実証機関	愛知県	
製品名称	高感度フェニトロチオン測定キット	
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	フェニトロチオン	
実証試験計画書の策定	平成 16 年 12 月 3 日	
実証試験の実施期間	平成 16 年 12 月 13 日～平成 17 年 1 月 18 日	
1) 基本的な性能	実験データ	【参考：製品データ】
測定範囲	測定濃度 0.15～2.0 µg/L での相対値： 103～107%、CV：0.5～8.0%	0.15～2 µg/L
検出下限及び定量下限	測定濃度 0.15 µg/L の SD から求めた検出 下限(3SD)：0.03 µg/L、定量下限(10SD)： 0.11 µg/L	測定下限：0.15 µg/L (検出 下限、定量下限の記述なし)
繰返し再現性	測定濃度 0.5 µg/L での CV：5.3%	測定濃度 0.37～0.90 µg/L での CV：3.3～8.6%
日間再現性	測定濃度 0.15～2.0 µg/L での CV：2.5～ 8.4%	測定濃度 0.37～0.93 µg/L での CV：1.4～9.7%
期間再現性	開封一部使用後、冷蔵庫内で密封保存 1 ヶ 月後の測定濃度 0.15～2.0 µg/L での CV： 4.9～11.2%	保存安定性 6 ヶ月
プレート間再現性	測定濃度 0.15～2.0 µg/L での CV：2.6～ 5.5%	記述なし
交差反応性	交差反応率： E P N (27%) フェニトロチオン (1.4%)	交差反応率： E P N (34%) フェニトロチオン (1.0%)
その他	-	-
2) 実用的な性能		
回収特性	回収率 98～114 % (試料：河川水、添加妨害物質：フミン酸ナリ ウム)	回収率 111.8～113.7 % (試料：-、添加妨害物質： 玄米)
測定精度等	実試料(河川水)3試料のうち1試料が定 量下限(0.11 µg/L)以上 3回の繰返し測定結果 ELISA法：av.=0.21 µg/L、CV=8.4% GC/MS法：av.=0.22 µg/L、CV=8.8%	記述なし
その他	-	-
結果の検討と考察		
1) 製品性能の信頼性 実証試験で実施した基本性能7項目の全てについて、申請データ(0.15～2.0 µg/L)の濃度範囲において十分な信頼性が確認された。		
2) 一般環境モニタリングでの実用性 実試料として河川水試料を用いた実証試験の結果から、検出感度及び測定精度とも実用に耐えうると考え		

られた。また、測定値もGC/MS-SIM法の測定値と非常によく一致した。今後、マトリックスの異なる環境試料に対するデータを集積することにより、環境モニタリングへの実用化が可能と考えられた。

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、試料の前処理から測定結果が得られるまで約5時間で、同時に約25試料(3重測定)の測定が可能となる。なお、本試験でのGC/MS-SIM法では、3試料(3重測定)の測定に約3日が必要であった。

(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	6
3.3 実証試験実施場所	6
(1) E L I S A法	6
(2) 機器分析法	6
3.4 実証試験実施期間	6
4. 試験方法	7
4.1 共通して行う試験操作	7
(1) 製品の操作	7
(2) 検量線作成用標準溶液の調製	7
(3) 吸光度の測定	7
(4) 検量線の作成	7
(5) 実測濃度の算出	7
4.2 基本的な性能	8
(1) 測定範囲	8
(2) 検出下限及び定量下限	9
(3) 繰返し再現性	10
(4) 日間再現性	11
(5) 期間再現性	12
(6) プレート間再現性	13
(7) 交差反応性	14
4.3 実用的な性能	15
(1) 回収特性	15
(2) 測定精度等	16
5. 試験結果	17
5.1 基本的な性能	17
(1) 測定範囲	17
(2) 検出下限及び定量下限	18
(3) 繰返し再現性	20
(4) 日間再現性	21
(5) 期間再現性	23

(6) プレート間再現性	24
(7) 交差反応性	26
5.2 実用的な性能	28
(1) 回収特性	28
(2) 測定精度等	29
6. 実証試験結果の検討と考察	31
(1) 製品性能の信頼性	31
(2) 一般環境モニタリングでの実用性	31
(3) 製品操作等の簡便性	31

付属資料：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

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	記入欄
技術・製品の名称	ELISA 法（酵素免疫測定法）・高感度フェニトロチオン測定キット
実証申請者	株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー
実証試験実施者	愛知県環境調査センター
実証試験実施場所	〒462-0032 名古屋市北区辻町字流 7-6
実証試験実施期間	平成16年12月13日 ~ 平成17年1月18日
製品名	高感度フェニトロチオン測定キット
型番	E L 2 0 7 - 0 0
販売・製造元	株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー
重量（g）	350g
価格（円）	99,750円
分析対象物質	フェニトロチオン
対象環境媒体	水質・底質・生物・その他（農産物）
利用用途	残留農薬測定、環境水モニタリング
標準試薬・種類	付属（調製済／調製要）
操作環境（室温）	室温
製品保管条件	8 以下
製品保証期間	製造後 6ヶ月間
同時測定数（最多）	46 試料
全体測定時間	2 ~ 3 時間

1.2 実証試験結果

環境技術開発者が実証申請書に示した基本的な性能に関するデータと実証試験結果はよく一致し、申請どおりの基本性能を有していることを確認した。実用的な性能については、回収特性及び測定精度とも問題なく、測定値も機器分析による測定値とよく一致した。

(1) 基本的な性能

測定範囲

申請データ：0.15 ~ 2 µg/L

実証データ：0.15 ~ 2.0 µg/L

(変動係数 0.5 ~ 8.0%、相対値% 103 ~ 107%)

検出下限及び定量下限

申請データ：測定下限 0.15 µg/L (検出下限、定量下限のデータなし)

実証データ：検出下限 0.03 µg/L、定量下限 0.11 µg/L

繰返し再現性

申請データ：測定濃度 0.37 ~ 0.90 µg/L における変動係数 3.3 ~ 8.6 %

実証データ：測定濃度 0.5 µg/L における変動係数 5.3 %

日間再現性

申請データ：測定濃度 0.37 ~ 0.93 µg/L における変動係数 1.4 ~ 9.7 %

実証データ：測定濃度 0.15 ~ 2.0 µg/L における変動係数 2.5 ~ 8.4 %

期間再現性

申請データ：保存安定性 6 ヶ月

実証データ：開封し一部使用后、冷蔵庫内で 1 ヶ月間密閉保存したキットに対し、測定濃度 0.15 ~ 2.0 µg/L における変動係数 4.9 ~ 11.2 %

プレート間再現性

申請データ：記述なし

実証データ：測定濃度 0.15 ~ 2.0 µg/L における変動係数 2.6 ~ 5.5 %

交差反応性

申請データ：E P N 34 %、フェニトロチオンオクソン 1.0 %

実証データ：E P N 27 %、フェニトロチオンオクソン 1.4 %

(2) 実用的な性能

回収特性

申請データ：回収率 111.8 ~ 113.7% (妨害物質：玄米)

実証データ：回収率 98 ~ 114% (妨害物質：フミン酸ナトリウム)

測定精度等

申請データ：記述なし

実証データ：実試料（河川水）3 試料のうち 1 試料が定量下限（0.11 µg/L）以上の測定値を示した。以下にその 3 回測定による平均値、変動係数、及び機器分析（GC/MS - SIM）法による測定結果を示す。

E L I S A 法：平均値 0.21 µg/L、変動係数 8.4 %

機器分析法：平均値 0.22 µg/L、変動係数 8.8 %

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

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 京都市南区吉祥院車道町 48 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、フェニトロチオンに特異的なモノクローナル抗体を応用して、環境中（媒体：水質）のフェニトロチオンを測定する 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 2.3.1 製品データ

項目	記入欄
製品名	高感度フェニトロチオン測定キット
型番	E L 2 0 7 - 0 0
販売・製造元	株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー
重量 (g)	3 5 0 g
価格 (円)	9 9 , 7 5 0 円
分析対象物質	フェニトロチオン
対象環境媒体	水質・底質・生物・その他 (農産物)
利用用途	残留農薬測定、環境水モニタリング
標準試薬・種類	付属 { 調製済 / 調製要 }
操作環境 (室温)	室 温
製品保管条件	8 以下
製品保証期間	製造後 6 ヶ月間
同時測定数 (最多)	4 6 試料
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

所属部署 : 愛知県環境部水環境課

担当者氏名 : 柴田 明司 小園 康之

住 所 : 〒460-8501 名古屋市中区三の丸 3 - 1 - 2

電話番号 : 052-954-6221

F A X 番号 : 052-961-4025

e-mail アドレス : akiji_shibata@pref.aichi.lg.jp

yasushi_kozono@pref.aichi.lg.jp

3.2 実証試験実施者

所属部署：愛知県環境調査センター 応用化学部

担当者氏名：角脇 怜 小川 敏幸

住 所：〒462-0032 名古屋市北区辻町流7 - 6

電話番号：052-910-5494

F A X 番号：052-991-6241

e-mail アドレス：satoshi_kadowaki@pref.aichi.lg.jp

toshiyuki_ogawa@pref.aichi.lg.jp

3.3 実証試験実施場所

(1) E L I S A 法

愛知県環境調査センター 応用化学部

(2) 機器分析法

愛知県環境調査センター 応用化学部

3.4 実証試験実施期間

平成16年12月13日～平成17年1月18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、ELISAに係わる品質管理システムの試験操作手順（一般的な事項）に従って行った。

(2) 検量線作成用標準溶液の調製

製品の取扱説明書に記載の方法により、検量線用標準溶液の希釈系列を調製した。

(3) 吸光度の測定

吸光度は、マイクロプレートリーダー（TECAN 社製サンライズリモート）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波長 450nm で測定した標準溶液指定濃度系列の吸光度（3重測定の平均値）から、4-parameter logistic fitting 後、検量線を作成した（検量線作成用の解析ソフト：和光純薬（株）製 LS-PLATEmanager 2004）。

(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	フェニトロチオン
対象製品名	高感度フェニトロチオン測定キット
製品番号	ロット番号 K-H-FNP004E
製造年月日	平成 16 年 11 月 2 日
測定範囲(製品仕様)	0.15 ~ 2.0 µg/L
試験日時	平成 16 年 12 月 13 日 13:30 ~ 15:40
試験場所	愛知県環境調査センター 応用化学部
試験時室内温度	22.5
使用した市販標準品	MEP 標準品 和光純薬(株)製 製品番号 132-05533 ロット番号 RWE9339
検量線用ソフト名	LS-PLATEmanager 2004 (和光純薬(株)製)
試験機関・担当者	愛知県環境調査センター 小川敏幸

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

(2) 検出下限及び定量下限

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	フェニトロチオン
対象製品名	高感度フェニトロチオン測定キット
製品番号	ロット番号 K-H-FNP004E
製造年月日	平成 16 年 11 月 2 日
測定範囲(製品仕様)	0.15 ~ 2.0 µg/L
試験日時	平成 16 年 12 月 13 日 13:30 ~ 15:40
試験場所	愛知県環境調査センター 応用化学部
試験時室内温度	22.5
使用した市販標準品	MEP 標準品 和光純薬(株)製 製品番号 132-05533 ロット番号 RWE9339
検量線用ソフト名	LS-PLATEmanager 2004 (和光純薬(株)製)
試験機関・担当者	愛知県環境調査センター 小川敏幸

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

(3) 繰返し再現性

試験条件

本製品の繰返し再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.3 繰返し再現性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・繰返し再現性(標準試料試験)
対象物質	フェニトロチオン
対象製品名	高感度フェニトロチオン測定キット
製品番号	ロット番号 K-H-FNP004E
製造年月日	平成 16 年 11 月 2 日
測定範囲(製品仕様)	0.15 ~ 2.0 µg/L
試験日時	平成 16 年 12 月 13 日 13:30 ~ 15:40
試験場所	愛知県環境調査センター 応用化学部
試験時室内温度	22.5
使用した市販標準品	MEP 標準品 和光純薬(株)製 製品番号 132-05533 ロット番号 RWE9339
検量線用ソフト名	LS-PLATEmanager 2004 (和光純薬(株)製)
試験機関・担当者	愛知県環境調査センター 小川敏幸

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

(4) 日間再現性

試験条件

本製品の日間再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.4 日間再現性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・日間再現性(標準試料試験)
対象物質	フェニトロチオン
対象製品名	高感度フェニトロチオン測定キット
製品番号	ロット番号 K-H-FNP004E
製造年月日	平成 16 年 11 月 2 日
測定範囲(製品仕様)	0.15 ~ 2.0 µg/L
試験日時	平成 16 年 12 月 13 日 13:30 ~ 15:40 平成 16 年 12 月 15 日 13:00 ~ 15:00 平成 16 年 12 月 17 日 13:00 ~ 16:40
試験場所	愛知県環境調査センター 応用化学部
試験時室内温度	22.5 (12/13), 22.5 (12/15), 22.0 (12/17)
使用した市販標準品	MEP 標準品 和光純薬(株)製 製品番号 132-05533 ロット番号 RWE9339
検量線用ソフト名	LS-PLATEmanager 2004 (和光純薬(株)製)
試験機関・担当者	愛知県環境調査センター 小川敏幸

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

(5) 期間再現性

試験条件

本製品の期間再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.5 期間再現性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・期間再現性(標準試料試験)
対象物質	フェニトロチオン
対象製品名	高感度フェニトロチオン測定キット
製品番号	ロット番号 K-H-FNP004E
製造年月日	平成 16 年 11 月 2 日
測定範囲(製品仕様)	0.15 ~ 2.0 µg/L
試験日時	平成 16 年 12 月 13 日 13:30 ~ 15:40 平成 17 年 1 月 18 日 14:00 ~ 17:30
試験場所	愛知県環境調査センター 応用化学部
試験時室内温度	22.5 (12/13), 21.0 (1/18)
使用した市販標準品	MEP 標準品 和光純薬(株)製 製品番号 132-05533 ロット番号 RWE9339
検量線用ソフト名	LS-PLATEmanager 2004 (和光純薬(株)製)
試験機関・担当者	愛知県環境調査センター 小川敏幸

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

(6) プレート間再現性

試験条件

本製品のプレート間再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.6 プレート間再現性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・プレート間再現性(標準試料試験)
対象物質	フェニトロチオン
対象製品名	高感度フェニトロチオン測定キット
製品番号	ロット番号 K-H-FNP004E, K-H-FNP003E
製造年月日	平成 16 年 11 月 2 日(K-H-FNP004E) 平成 16 年 9 月 22 日(K-H-FNP003E)
測定範囲(製品仕様)	0.15 ~ 2.0 µg/L
試験日時	平成 16 年 12 月 17 日 13:00 ~ 16:00
試験場所	愛知県環境調査センター 応用化学部
試験時室内温度	22.0
使用した市販標準品	MEP 標準品 和光純薬(株)製 製品番号 132-05533 ロット番号 RWE9339
検量線用ソフト名	LS-PLATEmanager 2004 (和光純薬(株)製)
試験機関・担当者	愛知県環境調査センター 小川敏幸

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

(7) 交差反応性

試験条件

本製品の交差反応性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.7 交差反応性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・交差反応性(標準試料試験)
対象物質	フェニトロチオン
対象製品名	高感度フェニトロチオン測定キット
製品番号	ロット番号 K-H-FNP004E
製造年月日	平成 16 年 11 月 2 日
測定範囲(製品仕様)	0.15 ~ 2.0 µg/L
試験日時	平成 16 年 12 月 20 日 13:00 ~ 16:00
試験場所	愛知県環境調査センター 応用化学部
試験時室内温度	21.0
検量線用ソフト名	LS-PLATEmanager 2004 (和光純薬(株)製)
試験機関・担当者	愛知県環境調査センター 小川敏幸

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	MEP 標準品	和光純薬(株)製	残留農薬試験用	200mg	132-05533	RWE9339
類似物質	EPN 標準品	和光純薬(株)製	残留農薬試験用	200mg	052-02841	YPK9696
	MEP オゾン標準品	和光純薬(株)製	残留農薬試験用	200mg	131-11691	YPQ9897

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

4.3 実用的な性能

(1) 回収特性

試験条件

本製品の回収特性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.3.1 回収特性の試験条件

項目	内容
実証項目	実用的な性能・回収特性(模擬環境試料試験)
対象物質	フェニトロチオン
対象製品名	高感度フェニトロチオン測定キット
製品番号	ロット番号 K-H-FNP004E
製造年月日	平成 16 年 11 月 2 日
測定範囲(製品仕様)	0.15 ~ 2.0 µg/L
試験日時	平成 16 年 12 月 27 日 13:00 ~ 15:30
試験場所	愛知県環境調査センター 応用化学部
試験時室内温度	19.0
使用した市販標準品	MEP 標準品 和光純薬(株)製 製品番号 132-05533 ロット番号 RWE9339
使用した模擬環境試料	アミノ酸トリウム アクス社製 製品番号 120860050 ロット番号 A019444301
検量線用ソフト名	LS-PLATEmanager 2004 (和光純薬(株)製)
試験機関・担当者	愛知県環境調査センター 小川敏幸

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	待合橋(五条川)	平成 16 年 12 月 10 日	4L	PH 7.0 COD 6.7 mgO/L

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

(2) 測定精度等

試験条件

本製品の測定精度等における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.3.2 測定精度等の試験条件

項目	内容
実証項目	実用的な性能・測定精度等(環境試料試験)
対象物質	フェニトロチオン
対象製品名	高感度フェニトロチオン測定キット
製品番号	ロット番号 K-H-FNP004E
製造年月日	平成 16 年 11 月 2 日
測定範囲(製品仕様)	0.15 ~ 2.0 µg/L
試験日時	平成 16 年 12 月 22 日 13:00 ~ 16:00
試験場所	愛知県環境調査センター 応用化学部
試験時室内温度	19.0
検量線用ソフト名	LS-PLATEmanager 2004 (和光純薬(株)製)
試験機関・担当者	愛知県環境調査センター 小川敏幸

表 4.3.3 使用した環境試料

試料番号	地点名	採水日	採水量	備考
S1	待合橋(五条川)	平成 16 年 12 月 10 日	4L	PH 7.0 COD 6.7 mgO/L
S2	萱津橋(新川)	平成 16 年 12 月 10 日	4L	PH 6.9 COD 8.9 mgO/L
S3	十三塚橋(合瀬川)	平成 16 年 12 月 10 日	4L	PH 7.6 COD 5.8 mgO/L

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

5. 試験結果

5.1 基本的な性能

(1) 測定範囲

検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

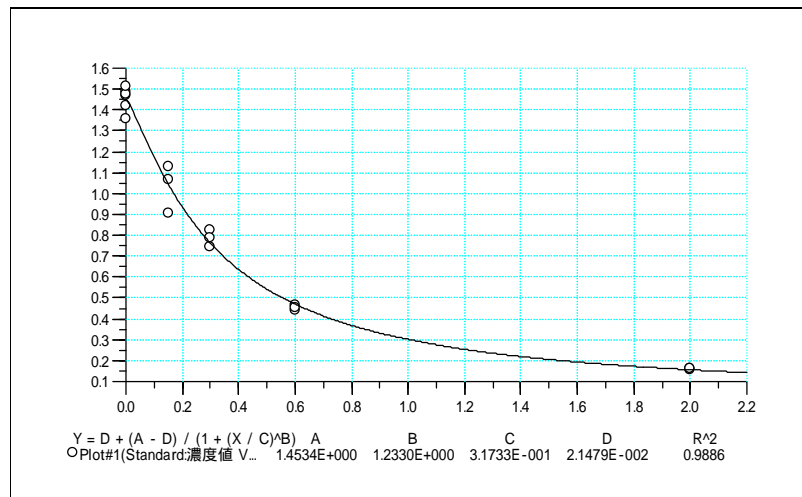
表 5.1.1 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	
所定濃度	μg/L	0	0.15	0.3	0.6	2.0	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.488	1.127	0.824	0.464	0.158
	2	-	1.469	0.907	0.744	0.444	0.160
	3	-	1.475	1.068	0.787	0.453	0.161

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	1.45	1.23	0.317	0.022	0.989

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		
調製濃度	μg/L	0.15	0.3	0.6	2.0		
実測回数	回	3	3	3	3		
ELISA 実測	吸光度	1	-	1.003	0.747	0.471	0.149
		2	-	1.042	0.745	0.429	0.139
		3	-	1.061	0.749	0.451	0.156
		平均	-	1.035	0.747	0.450	0.148
	換算値	μg/L	0.154	0.309	0.636	2.145	
標準偏差	μg/L	0.012	0.001	0.037	0.13		
変動係数	%	8.0	0.5	5.8	6.1		
相対値**	%	103	103	106	107		

** 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

検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

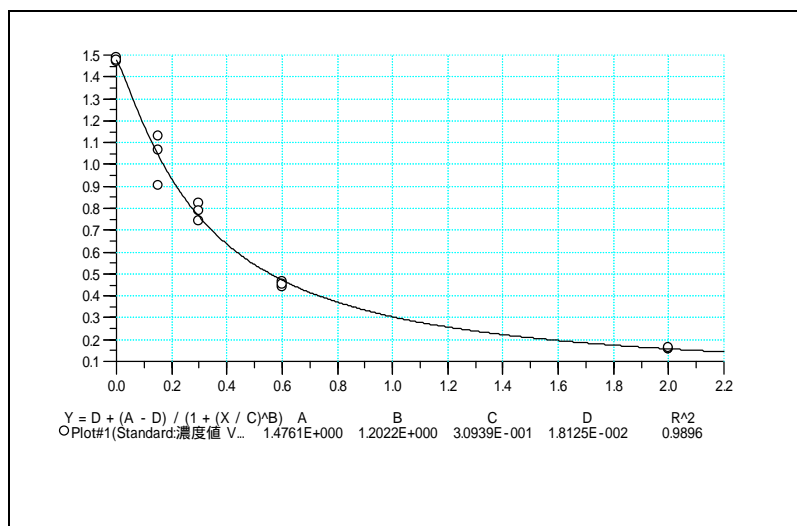
表 5.1.4 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	
所定濃度	μg/L	0	0.15	0.3	0.6	2.0	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.488	1.127	0.824	0.464	0.158
	2	-	1.469	0.907	0.744	0.444	0.160
	3	-	1.475	1.068	0.787	0.453	0.161

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	1.45	1.23	0.317	0.022	0.989

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 対象物質試料溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液									
		溶液 S1									
調製濃度	μg/L	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	
実測回数	回	1	2	3	4	5	6	7	8		
ELISA 実測	吸光度	1	-	1.054	1.078	1.099	1.180	1.056	0.997	1.054	1.112
		2	-	1.117	1.100	1.125	1.133	1.071	1.149	1.086	1.145
		3	-	1.162	1.102	1.065	1.139	1.175	1.069	1.133	1.147
	平均	-	1.111	1.093	1.096	1.151	1.101	1.072	1.091	1.135	
換算値	μg/L		0.157	0.229	0.180	0.211	0.192	0.185	0.192	0.164	
標準偏差	μg/L		0.023								

検出下限 (3 S D) = 0.03 μg/L

定量下限 (1 0 S D) = 0.11 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。

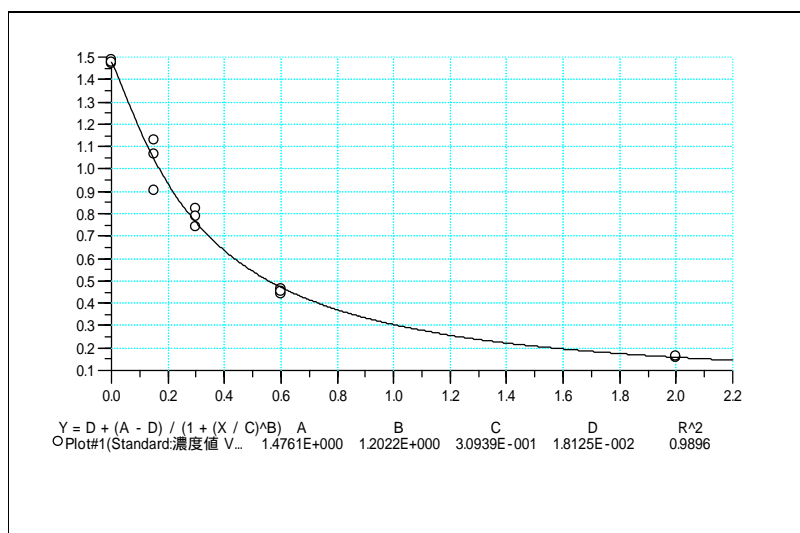
表 5.1.7 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	
所定濃度	μg/L	0	0.15	0.3	0.6	2.0	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.488	1.127	0.824	0.464	0.158
	2	-	1.469	0.907	0.744	0.444	0.160
	3	-	1.475	1.068	0.787	0.453	0.161

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	1.45	1.23	0.317	0.022	0.989

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 S5									
調製濃度	μg/L	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5		
実測回数	回	1	2	3	4	5	6	7	8		
ELISA 実測	吸光度	1	-	0.539	0.481	0.531	0.518	0.554	0.570	0.571	0.516
		2	-	0.533	0.537	0.561	0.469	0.536	0.500	0.546	0.565
		3	-	0.495	0.519	0.518	0.580	0.584	0.590	0.568	0.499
		平均	-	0.522	0.512	0.537	0.522	0.558	0.553	0.562	0.527
	換算値	μg/L	0.527	0.541	0.508	0.530	0.482	0.490	0.477	0.522	
標準偏差	μg/L	0.024									
変動係数	%	5.3									

(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 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	
所定濃度	μg/L	0	0.15	0.3	0.6	2.0	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.488	1.127	0.824	0.464	0.158
	2	-	1.469	0.907	0.744	0.444	0.160
	3	-	1.475	1.068	0.787	0.453	0.161

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

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.45	1.23	0.317	0.022	0.990

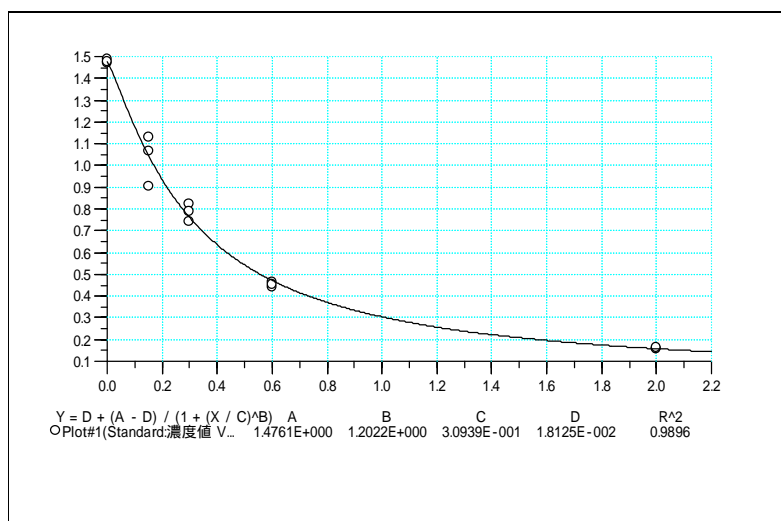


図 5.1.4 検量線

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 5.1.12 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			
		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	0.15	0.15	0.15	0.3	0.3	0.3	0.6	0.6	0.6	2.0	2.0	2.0	
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
ELISA 実測	1	-	1.003	1.175	0.948	0.747	0.654	0.619	0.471	0.419	0.403	0.149	0.146	0.128
	2	-	1.042	1.075	1.028	0.745	0.770	0.630	0.429	0.458	0.399	0.139	0.149	0.129
	3	-	1.061	1.067	1.003	0.749	0.778	0.711	0.451	0.466	0.460	0.156	0.155	0.138
	平均	-	1.035	1.106	0.993	0.747	0.734	0.653	0.450	0.448	0.421	0.148	0.150	0.132
換算値	μg/L	0.154	0.162	0.158	0.309	0.352	0.336	0.636	0.659	0.575	2.145	2.391	2.030	
標準偏差	μg/L	0.004			0.022			0.043			0.18			
変動係数	%	2.5			6.5			7.0			8.4			

(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。

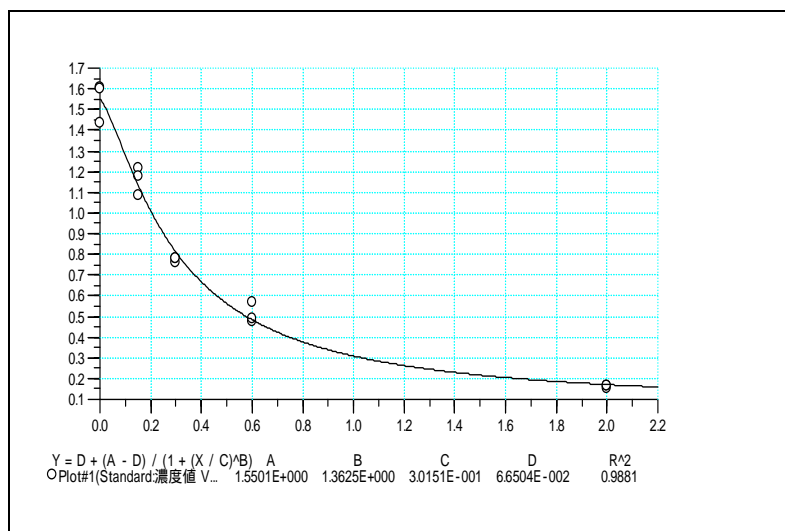
表 5.1.13 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	
所定濃度	μg/L	0	0.15	0.3	0.6	2.0	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.606	1.082	0.761	0.478	0.156
	2	-	1.598	1.216	0.778	0.488	0.165
	3	-	1.435	1.177	0.779	0.571	0.169

表 5.1.14 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D) / (1 + (X / C)^B)$]

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.55	1.36	3.02	0.067	0.988

図 5.1.5 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 5.1.15 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			
		0	1ヶ月	0	1ヶ月	0	1ヶ月	0	1ヶ月		
調製濃度	μg/L	0.15	0.15	0.3	0.3	0.6	0.6	2.0	2.0		
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	3	3		
ELISA 実測	吸光度	1	-	1.175	0.899	0.654	0.612	0.419	0.349	0.146	0.105
		2	-	1.075	0.939	0.77	0.624	0.458	0.355	0.149	0.114
		3	-	1.067	0.966	0.778	0.662	0.466	0.385	0.155	0.112
	平均	-	1.106	0.935	0.734	0.633	0.448	0.363	0.150	0.110	
換算値	μg/L	0.162	0.175	0.352	0.337	0.659	0.599	2.391	2.538		
標準偏差	μg/L	0.023	0.016	0.051	0.017	0.044	0.029	0.101	0.284		
変動係数	%	13.9	9.1	14.5	5.0	6.7	4.9	4.2	11.2		

* 実測は3重測定以上とする

(6) プレート間再現性

検量線作成記録

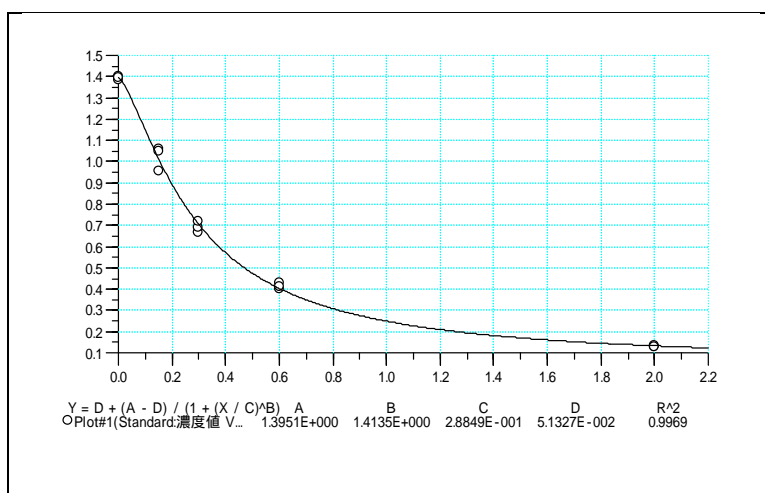
表 5.1.16 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	
所定濃度	μg/L	0	0.15	0.3	0.6	2.0	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測* (吸光度)	1	-	1.400	0.957	0.665	0.429	0.129
	2	-	1.387	1.059	0.69	0.398	0.132
	3	-	1.394	1.047	0.718	0.415	0.129

表 5.1.17 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	1.395	1.414	0.288	0.051	0.997

図 5.1.6 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 5.1.18 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			
		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	0.15	0.15	0.15	0.3	0.3	0.3	0.6	0.6	0.6	2.0	2.0	2.0	
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
ELISA 実測	1	-	0.948	0.928	0.981	0.619	0.643	0.677	0.403	0.377	0.412	0.128	0.127	0.137
	2	-	1.028	0.940	1.010	0.630	0.669	0.687	0.399	0.39	0.424	0.129	0.125	0.137
	3	-	1.003	0.948	0.969	0.711	0.674	0.713	0.460	0.409	0.429	0.138	0.146	0.144
	平均	-	0.993	0.939	0.987	0.653	0.662	0.692	0.421	0.392	0.422	0.132	0.133	0.139
換算値	μg/L	0.158	0.172	0.166	0.336	0.329	0.319	0.575	0.636	0.584	2.030	2.035	2.124	
標準偏差	μg/L	0.007			0.009			0.033			0.053			
変動係数	%	4.2			2.6			5.5			2.6			

* プレート A,B は同一ロット、プレート C は異ロット。

(7) 交差反応性

検量線作成記録

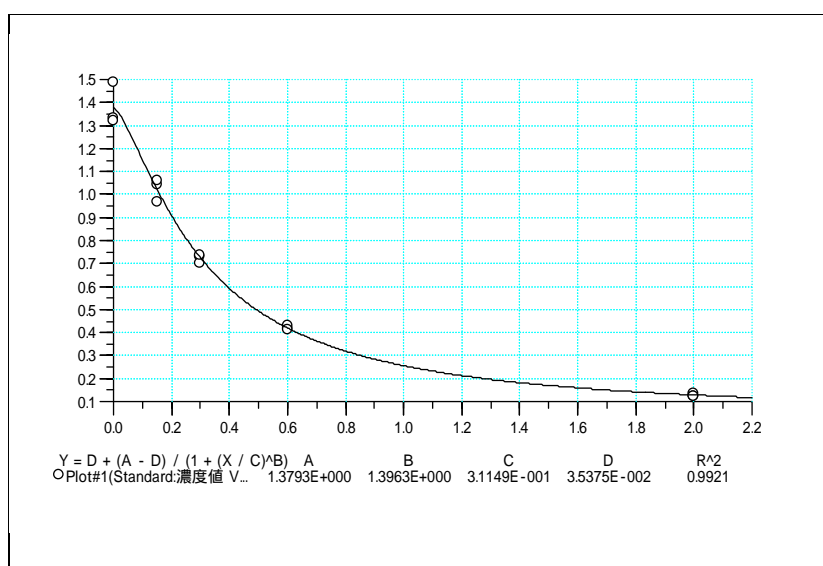
表 5.1.19 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	
所定濃度	μg/L	0	0.15	0.3	0.6	2.0	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測* (吸光度)	1	-	1.331	1.043	0.733	0.417	0.134
	2	-	1.320	0.967	0.704	0.428	0.126
	3	-	1.487	1.059	0.739	0.413	0.126

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

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.379	1.396	0.311	0.035	0.992

図 5.1.7 検量線



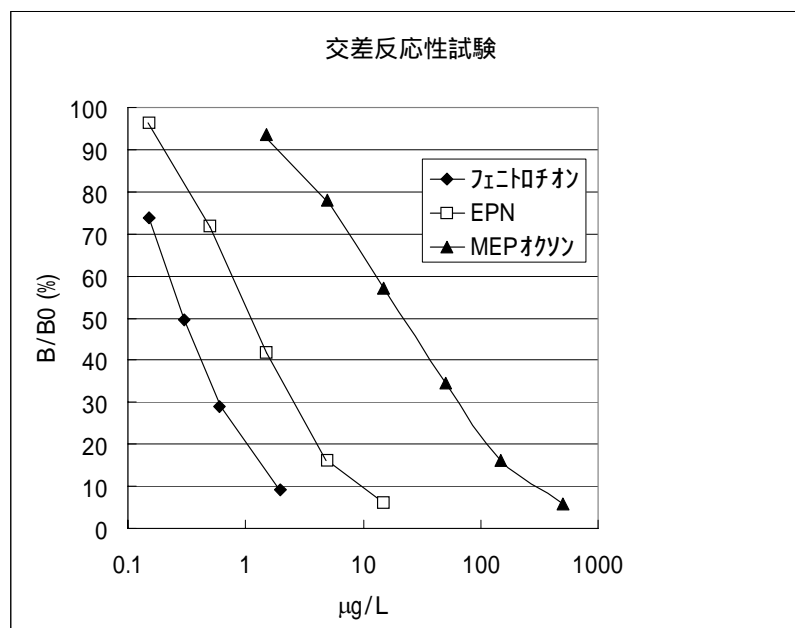
試験結果記録

	フェニチン	EPN	MEP オカ
50%阻害濃度(μg/L)	0.307	1.13	22.3
交差率(%)	100	27	1.4

フェニトロチオン			ブランク	溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4
所定濃度	μg/L		0	0.15	0.3	0.6	2.0
実測回数	回		3	3	3	3	3
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.369	1.060	0.699	0.405	0.135
	2	-	1.315	0.985	0.682	0.396	0.118
	3	-	1.472	1.020	0.678	0.400	0.124

EPN			ブランク	溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4	溶液 S5
所定濃度	μg/L		0	0.15	0.5	1.5	5.0	15
実測回数	回		3	3	3	3	3	3
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.397	1.436	0.978	0.618	0.217	0.083
	2	-	1.355	1.282	0.990	0.560	0.223	0.080
	3	-	1.379	1.259	1.000	0.546	0.226	0.085

MEP オクソン			ブランク	溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4	溶液 S5	溶液 S6
所定濃度	μg/L		0	1.5	5.0	15	50	150	500
実測回数	回		3	3	3	3	3	3	3
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.321	1.275	1.041	0.813	0.471	0.220	0.077
	2	-	1.416	1.317	1.135	0.815	0.480	0.222	0.080
	3	-	1.451	1.327	1.092	0.762	0.494	0.240	0.092



5.2 実用的な性能

(1) 回収特性

検量線作成記録

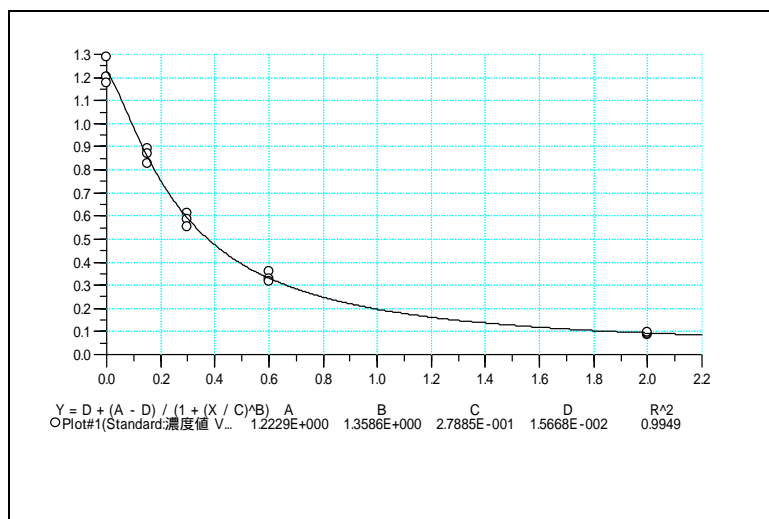
表 5.2.1 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	
所定濃度	μg/L	0	0.15	0.3	0.6	2.0	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.289	0.892	0.610	0.362	0.087
	2	-	1.202	0.827	0.586	0.325	0.093
	3	-	1.176	0.869	0.554	0.319	0.096

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	1.223	1.359	0.279	0.017	0.995

図 5.2.1 検量線



試験結果記録

項目		単位	試験用試料溶液 (フェニチオン 0.5μg/L 添加)					
フミン酸 Na 添加量		mg/L	0	1	5	10	50	
実測回数		回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測	吸光度	1	-	0.363	0.348	0.351	0.366	0.353
		2	-	0.403	0.363	0.335	0.346	0.336
		3	-	0.435	0.364	0.367	0.364	0.352
		平均	-	0.400	0.358	0.351	0.359	0.347
	換算値	μg/L	0.490	0.551	0.564	0.551	0.571	
	変動係数	%	10.2	2.7	4.9	3.4	3.0	
	回収率	%	98	110	113	110	114	

(2) 測定精度等

検量線作成記録

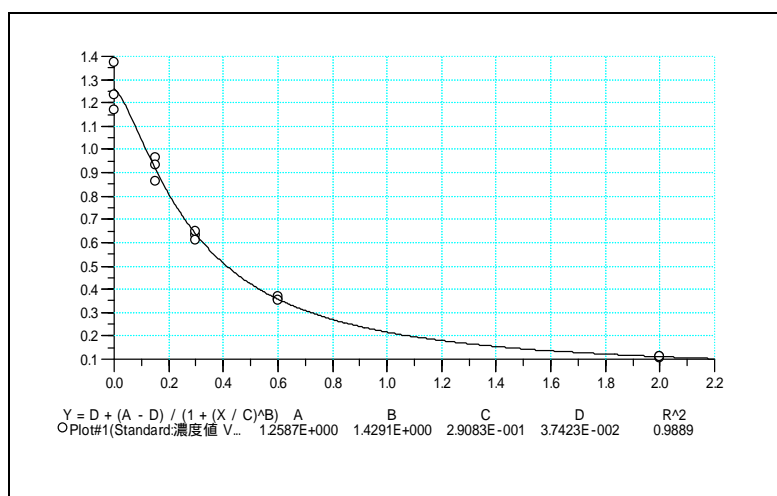
表 5.2.3 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	
所定濃度	μg/L	0	0.15	0.3	0.6	2.0	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.169	0.863	0.632	0.356	0.107
	2	-	1.371	0.964	0.612	0.370	0.111
	3	-	1.235	0.93	0.650	0.354	0.111

表 5.2.4 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	1.259	1.429	0.291	0.037	0.989

図 5.2.2 検量線



試験結果記録

		ELISA			GC/MS
		未処理	ろ液	ろ液 + SS抽出液	
待合橋	測定濃度 1	0.03	0.03	ND	0.04
	測定濃度 2	0.03	0.04	0.04	0.04
	測定濃度 3	ND	ND	0.06	0.05
	平均濃度	-	-	-	0.04
	変動係数 (%)	-	-	-	1.3
萱津橋	測定濃度 1	ND	ND	0.06	0.09
	測定濃度 2	ND	ND	0.04	0.08
	測定濃度 3	0.03	0.06	0.06	0.09
	平均濃度	-	-	0.05	0.09
	変動係数 (%)	-	-	18.6	1.8
十三塚橋	測定濃度 1	0.19	0.23	0.22	0.20
	測定濃度 2	0.21	0.22	0.23	0.23
	測定濃度 3	0.23	0.19	0.26	0.24
	平均濃度	0.21	0.21	0.24	0.22
	変動係数 (%)	8.4	7.8	9.1	8.8

* 濃度の単位はμg/L、ELISA の検出下限は 0.03 μg/L、定量下限は 0.11 μg/L。

G C / M S の検出下限は 0.006 μg/L、定量下限は 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7項目の全てについて、申請データ(0.15~2.0 µg/L)の濃度範囲において十分な信頼性が確認された。

(2) 一般環境モニタリングでの実用性

実試料として河川水試料を用いた実証試験の結果から、検出感度及び測定精度とも実用に耐えうると考えられた。また、測定値もGC/MS-SIM法の測定値と非常によく一致した。今後、マトリックスの異なる環境試料に対するデータを集積することにより、環境モニタリングへの実用化が可能と考えられた。

(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、試料の前処理から測定結果が得られるまで約5時間で、同時に約25試料(3重測定)の測定が可能となる。なお、本試験でのGC/MS-SIM法では、3試料(3重測定)の測定に約3日が必要であった。

(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：ELISA法（酵素免疫測定法） 製品の名称：高感度フェニトロチオン測定キット

平成16年12月

愛知県

はじめに

本実証試験計画書は、「化学物質に関する簡易モニタリング技術 実証試験要領（平成16年8月31日 環境省総合環境政策局）」（以下、「実証試験要領」という。）に基づいて選定された実証対象技術について、実証機関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）

愛知県環境調査センター

所長 近藤 徳雄



（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 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 実証試験の種類	1
2 . 実証試験の参加組織と実証試験参加者の責任分掌	2
2.1 実証試験の参加組織	2
2.2 実施体制	2
2.3 実証試験参加者の責任分掌	3
3 . 実証試験の対象とする化学物質簡易モニタリング技術の概要	4
3.1 実証対象製品の原理	4
3.2 実証対象製品のデータ	5
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	12
日間再現性試験	12
期間再現性試験	12
プレート間再現性試験	12
交差反応性試験	12
(2) 実用的な性能試験	13
回収特性試験	13
測定精度試験	13
5 . データの品質管理	14
6 . データの管理、分析、表示	14
6.1 データ管理とその方法	14
6.2 データ分析と表示	14
7 . 評価	15

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

付録 4：品質管理システム（ELISA測定用）および（機器分析用）

1. 実証試験の概要と目的

1.1 実証試験の概要と目的

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

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

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

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

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

1.2 実証試験の種類

本実証試験では、以下の視点から実証を行うものとする。

製品性能の信頼性

一般環境モニタリングでの実用性

製品操作等の簡便性

2. 実証試験参加組織と実証試験参加者の責任分掌

2.1 実証試験参加組織

実証試験に参加する組織は、下表に示すとおりである。

表2.1.1 実証試験参加組織

実証機関	団体名	愛知県環境調査センター
	住所	〒462-0032 名古屋市北区辻町字流 7-6
	担当者所属・氏名	応用化学部 部長 角脇 怜
	電話番号	052-910-5494
	FAX 番号	052-991-6241
	E-mail アドレス	satoshi_kadowaki@pref.aichi.lg.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。

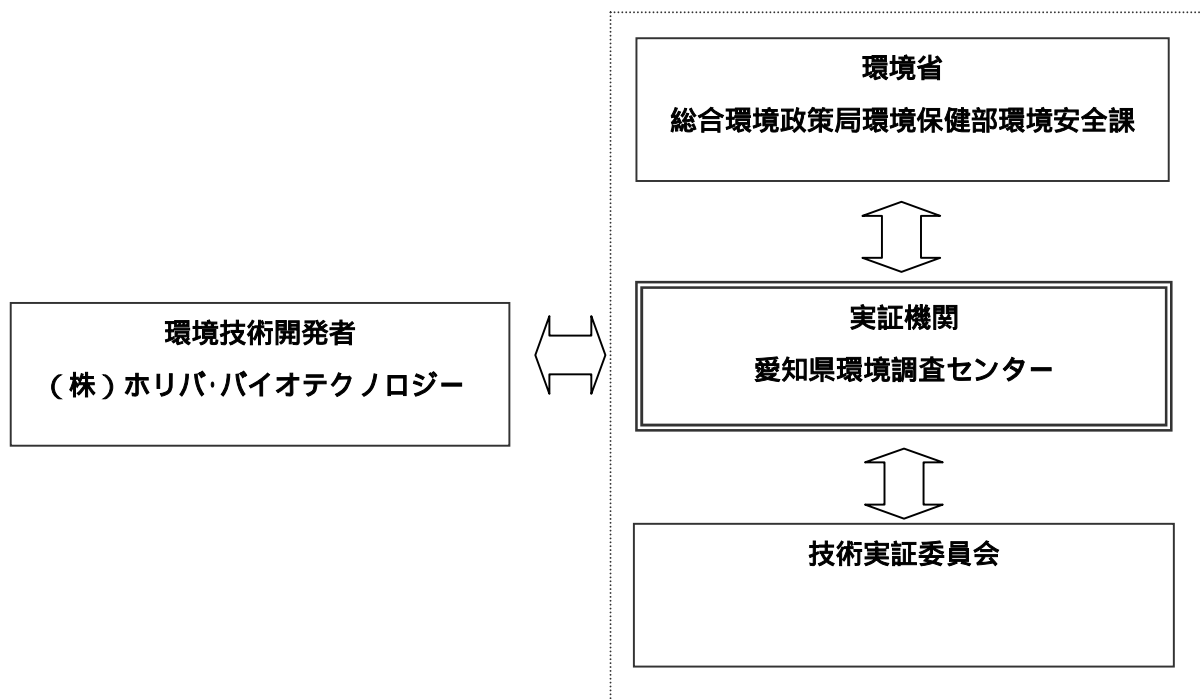


図 2.2 実証試験の実施体制

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	応用化学部 長	角脇 怜
	実証試験における ELISA 法の総括責任者	技師	小川 敏幸
	実証試験における ELISA 法担当者	技師	岩田 杉夫
	実証試験における ELISA 法担当者	技師	中根 知康
	実証試験における機器分析の総括責任者	主任研究員	宇佐見 義博
	実証試験における機器分析担当者	技師	岩田 杉夫
	実証試験における機器分析担当者	技師	小川 敏幸
	実証試験における機器分析担当者	技師	中根 知康
	実証試験における精度管理の総括責任者	応用化学部 長	角脇 怜
	実証試験における精度管理担当者	主任研究員	宇佐見 義博
	実証試験における精度管理担当者	技師	小川 敏幸
	実証試験品質管理者	環境調査セ ンター研究 監	高橋 邦夫
	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
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 次長	門脇 篤
実証試験実施上の参考情報の提供		企画・営業推 進部 部長	三宅 司郎

3. 実証試験の対象とする化学物質簡易モニタリング技術の概要

3.1 実証対象技術の原理

この実証対象製品は、申請者が開発したフェニトロチオン（MEP）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、農産物中の高感度フェニトロチオン測定 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

項目	記入欄
製品名	高感度フェニトロチオン測定キット
型番	EL207-00
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	フェニトロチオン
対象環境媒体	水質・底質・生物・その他（農産物）
利用用途	残留農薬測定、環境水モニタリング
標準試薬・種類	付属（調製済 / 調製要）
操作環境（室温）	室温
製品保管条件	8 以下
製品保証期間	製造後 6 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（固相抽出等の前処理時間を除く）

項目	記入欄
1. 基本的な性能	
測定範囲	0.15~2µg/L
検出下限及び定量下限	(記載なし)
繰返し再現性	標準偏差：0.02~0.04 変動係数：3.3~8.6 %
日間再現性	標準偏差：0.01~0.06 変動係数：1.4~9.7 %
期間再現性	保存安定性(付録2)
プレート間再現性	(記載なし)
交差反応性	34% (EPN) 12% (パラチオン) 6.9% (パラチオンメチル)
その他	(記載なし)
2. 実用的な性能	
回収特性	回収率:138.1~151.0%, 111.8~113.7 %
測定精度等	(記載なし)
その他	(記載なし)
試験責任者	伊東 茂壽
試験年月日	(記載なし)

以下の項目については、付録0~3に添付する。

付録0：取扱説明書（申請書類に添付された取扱説明書）

付録1：技術仕様書（申請書類の添付資料1）

付録2：自社による性能試験結果（申請書類の添付資料2~5）

付録3：参考となるその他の文書やデータ等（申請書類における【4】、【5】の項目）

4. 実証試験のデザイン

4.1 実証試験の期間

実証試験の期間は、平成 16 年 11 月 29 日～平成 17 年 1 月 7 日とする。また、その期間のスケジュールは、下表に示すとおりである。

表 2.1.1 実証試験のスケジュール(予定)

	11 月	12 月				1 月
	5 週	1 週	2 週	3 週	4 週	2 週
実証試験計画の策定						
対象技術の選定、計画書案作成						
実証試験計画書策定、承認						
実証試験の実施						
測定範囲の検討						
検出限界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						
内部監査の実施						
実証試験結果中間報告						
技術実証委員会の実施						

4.2 実証試験の内容

実証試験項目の内容は、表 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

ELISA キット受領時の状態について、搬入者の立ち会いの元に、受領の記録を ELISA キット管理表（様式 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、搬入者と協議し適切な処置をとる。

(2) ELISA キットの管理

ELISA キットは、変質しないように、取扱説明書に記載された保管条件で適切に保管・管理する。

ELISA キットの分轄を行う場合は、汚染や品質低下のない方法で行い、識別番号等必要な表示を行うとともに、分轄の年月日その他必要な事項を管理表に記録する。

ELISA キット管理表 (様式 4.3)

受領年月日 _____ 時 分 _____ 搬入者 _____

番号 (管理番号) _____ - _____

メーカー名 _____

品名 _____

Lot . No. _____

搬入時確認事項

- 包装等に破損がない
- 保管温度 ()
- 搬入時の温度管理
- 使用期限
- その他異常なし

保管場所 _____

保管温度 _____

受領者 _____

(移動・分轄等の記録)

番号 (管理番号) _____ - _____

メーカー名 _____

品名 _____

Lot . No. _____

搬入時確認事項

- 包装等に破損がない
- 保管温度 ()
- 搬入時の温度管理
- 使用期限
- その他異常なし

保管場所 _____

保管温度 _____

受領者 _____

(移動・分轄等の記録)

4.4 実証試験の方法

基本的な性能試験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、「品質管理システム」(付録 4) 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

調製済み

ウ．吸光度の測定

吸光度は、マイクロプレートリーダー(TECAN 社製サンライズリモート)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 で測定した標準溶液指定濃度系列の吸光度(3重測定の平均値)から、4-parameter logistic fitting 後、検量線を作成する(検量線作成用の解析ソフト:和光純薬(株)製 LS-PLATEmanager 2004)。

オ．実測濃度の算出

エ．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

フェニトロチオンの市販標準物質（和光純薬製 MEP 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、試験用試料溶液を作成する。

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	試料名及び試料溶液調製濃度 (µg/L)					
標準溶液指定濃度系列 (要調製)	フェニトロチオン	0, 0.15, 0.3, 0.6, 2.0					
測定範囲 日間再現性 期間再現性 プレート間再現性	フェニトロチオン	0, 0.15, 0.3, 0.6, 2.0					
検出下限及び定量下限	フェニトロチオン	0.15					
繰返し再現性	フェニトロチオン	0.5					
交差反応性	EPN	0.15	0.5	1.5	5.0	15	
	フェニトロチオン カクソ	1.5	5.0	15	50	150	500

測定範囲

調製した指定濃度範囲の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、調製濃度と実測濃度との比較、指定された測定範囲の妥当性などについて検討する。

検出下限及び定量下限試験

調製した指定濃度系列の下限付近の 1 濃度を 8 回測定し、3 重測定の平均吸光度から算出した 8 個の実測濃度より標準偏差 (SD) を求める。求めた SD から得られた 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

調製した指定濃度系列内の中央付近の 1 濃度を 3 重測定で 8 回測定し、3 重測定の平均吸光度から算出した 8 個の実測濃度より平均値、標準検査、変動係数(CV)を求める。

求めた変動係数 (CV、n=8) から、繰返し再現性について製品仕様の妥当性を検討する。

日間再現性試験

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

期間再現性試験

1 ヶ月以上離れた製造年月日の 2 枚のプレートを用いて、(同一測定者が) 同時に「測定範囲試験」と同じ測定操作・検討を行う。各調製濃度について得られた各プレートの実測濃度の平均値、変動係数を求め、その結果の比較から製品仕様の期間再現性の妥当性を検討する。

プレート間再現性試験

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

交差反応性試験

フェニトロチオン及び類似物質 (EPN、フェニトロチオンオクソン) を用いて、指定濃度系列で吸光度曲線 (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 (EPN、フェニトロチオンオクソン) の 50% 発色阻害濃度を求める。(フェニトロチオンの 50% 阻害濃度 / 類似物質の 50% 阻害濃度) × 100 (%) で交差率を求め、類似物質の交差反応性を検討する。

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

(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、それに指定濃度範囲の中央付近の 1 濃度となるように市販標準物質（フェニトロチオン）を添加するとともに、妨害物質として標準フミン質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、フミン質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	試料名及び調製濃度
分析対象物質：フェニトロチオン	0.5 μg/L
妨害物質：フミン酸	1, 5, 10, 50 mg/L

測定精度試験

複数の河川地点から得られた河川水について、フェニトロチオンを測定する。但し、必要に応じて固層抽出等による前処理操作を行う。

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

また、製品仕様の前処理の妥当性（操作時間、操作ステップ数、操作の難易）及び操作簡便性（測定時間、操作ステップ数、標準溶液・反応液の調製の難易）について、環境試料への適用性の観点から検討する。

5. データの品質管理

(1) 測定操作の記録

ア. 実証試験過程で入手、作成した文書(デジタル画像を含む)及び記録については適切に管理・保管する。

イ. 実証項目の試験は、「品質管理システム」(付録4)に従って行い、その分析作業台帳及び分析機器の点検事項等は、記録に残す。

(2) データ処理の管理

ア. 試験データの計算や転記について、当該実施者以外の監督者によるチェックを行い、記録を残す。

イ. 試験データをコンピュータにデータファイルとして保存する場合には、関係のない者がデータファイルにアクセスしないように制限する。データ入力の記録を残し、無許可のデータ修正を予防する。

ウ. データファイルの紛失の可能性があるときは、バックアップを取りデータを保護する。

6. データの管理、分析、表示

6.1 データ管理

(1) データの管理とその方法

本実証試験から得られる以下のデータは、「品質管理システム」に従って管理するものとする。

また、本実証試験の品質管理者は、環境調査センター 研究監 高橋 邦夫とする。

6.2 データ分析と表示

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

実証項目の測定結果の分析・表示方法は以下のとおりである。

(1) 基本的な性能試験

測定範囲

・調製濃度と実測濃度との相対値、実測濃度の変動係数

測定下限及び定量下限

・実測濃度の標準偏差

繰返し再現性

・実測濃度の変動係数

日間再現性

- ・実測濃度の変動係数

プレート間再現性

- ・実測濃度の変動係数

期間再現性

- ・調製濃度と実測濃度との相対値、実測濃度の変動係数

交差反応性

- ・類似物質の交差反応率

(2)実用的な性能試験

回収特性

- ・調製濃度と実測濃度の比率（回収率）

測定精度

- ・ ELISA の実測濃度と機器分析の実測濃度との相関係数及び回帰式

7. 評価

本実証試験で得られたデータの品質監査は、「品質管理システム」(付録4)に従って行うものとする。

実証試験が適切に実施されていることを確認するために実証試験の期間中に1回内部監査を実施する。

この内部監査は、大気圏部長 高梨 俊治を内部監査員として任命し実施する。

内部監査員は、内部監査の結果を品質管理責任者及び愛知県環境調査センター所長に報告する。

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 : 品質管理システム

スマートアッセイ シリーズ (環境測定用)

高感度フェニトロチオン測定キット

1. はじめに

本品は、フェニトロチオン(農薬商品名:スミチオン, 住友化学工業社製)と、その抗体との特異的反応を利用した酵素免疫測定法 (Enzyme linked Immunosorbent Assay, ELISA) によるフェニトロチオンの測定キットです。フェニトロチオンの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、環境水等中のフェニトロチオンを ELISA で測定するものです。すなわち、フェニトロチオン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、抗原 (標準試液または未知試料中のフェニトロチオン)と標識抗原(フェニトロチオン酵素標識物)とを同時に加えて反応させます(競合反応)。反応後、上清(遊離型標識抗原)を吸引除去し、プレートに結合した標識抗原(結合型標識抗原)の酵素活性を吸光度法により計測します。その吸光度は結合型標識抗原量を反映し、標準試液または未知試料中のフェニトロチオン量に反比例します。標準試液のフェニトロチオン濃度に対し、その吸光度をプロットして作成した検量線から未知試料中のフェニトロチオン濃度を求めます。

3. 測定キットの特徴

- 1)高感度** - フェニトロチオンを 0.15 ~ 2 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** - 前処理が簡単のため、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、測定場所を特に選ばないため、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。
1キットで 96 回の測定ができます。

第1表 キットの構成

品名	容量	剤型	数量
フェニトロチオン抗体プレート	8ウエル×12列 (96ウエル)	乾燥品	1枚
フェニトロチオン標準試薬 (2 ppm)	1.5 mL	液状品	4バイアル
フェニトロチオン酵素標識物試薬	6 mL	凍結乾燥品	2バイアル
洗浄試薬(10倍濃縮)	50 mL	液状品	1バイアル
発色試薬	13 mL	液状品	1バイアル
発色停止試薬	13 mL	液状品	1バイアル
プレートシール			1枚

5. 測定に必要な試薬・器具・装置

(1)試薬

高感度フェニトロチオン測定キット:ホリバ・バイオテクノロジー社製
精製水
メタノール:環境分析用
10%メタノール:精製水を用いて 10 倍希釈

(2)器具

マイクロピペット(50 ~ 200 μ L,1000 μ L)および専用チップ
メスシリンダー:500 mL
試験管:ガラス製、10 mL
ホールピペット:ガラス製
メスフラスコ:ガラス製
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

ストップウォッチ:秒単位まで表示
試験管ミキサー
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)
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. 試液の調製

1)試液調製上の留意事項

- 試薬は、使用 30 分前に冷蔵庫から出し、室温に戻してから使用して下さい。
- 試液調製時のピペット操作は、可能な限り正確に行ってください。
- 製造番号の異なるキットの構成試薬を組み合わせ使用しないで下さい。
- フェニトロチオン標準試液は必ず使用時に調製して下さい。
- フェニトロチオン標準試薬原液の溶媒であるメタノールが揮発しますので、分取後は速やかにキャップを締めて下さい。

2) 試液の調製

フェニトロチオン抗体プレート

そのまま用います。

フェニトロチオン標準試液

ステップ-1 からステップ-3 の手順で調製します。正確を期すために、調製にはメスフラスコおよびホールピペットの使用をお勧めします。

a) ステップ-1

フェニトロチオン標準試薬 (2 ppm) をメタノールで 100 倍希釈し、100 倍希釈液 (20 ppb) を調製します。

b) ステップ-2

100 倍希釈液 (20 ppb) を精製水で 10 倍希釈し、10 倍希釈液 (2 ppb; 10%メタノール溶液) を調製します。

c) ステップ-3

10 倍希釈液 (2 ppb; 10%メタノール溶液) と 10%メタノールを用いて下記濃度のフェニトロチオン標準試液を調製します。参考として 20 mL メスフラスコとホールピペットを用いた場合を記載しています。

標準試液濃度 (ppb)	2	0.6	0.3	0.15	0
10 倍希釈液 (mL)	*	6	3	1.5	*
10%メタノール (mL)	*	14	17	18.5	*

フェニトロチオン酵素標識物試液

酵素標識物試薬に精製水 6 mL を加えて溶解し、フェニトロチオン酵素標識物試液とします。

洗浄試液

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、洗浄試液とします。

発色試薬

そのまま用います。

発色停止試薬

そのまま用います。

7. 測定操作

1) 測定操作上の留意事項

分注液が、ウェルの壁面に付かないように分注して下さい。

マイクロプレートは、8 ウェルずつのストリップタイプになっていますので、必要なウェル数だけ使用することができます。未使用部分は、乾燥剤とともにチャック付きラミネート袋に戻し、密封して冷蔵保存しておけば、次回も使用することができます。

反応中は、マイクロプレートを静置して下さい。

分注する際は、泡が入らないように注意して下さい。

正確な分析を行うため、それぞれの反応時間は正確に行ってください。

プレート裏面には触れないように注意して下さい。

測定は、少なくとも 2 重測定 (Duplicate) で行って下さい。

2) 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% 溶液に調製します。

混合液の調製

フェニトロチオン標準試液または試料 150 μ L をマイクロピペット (50 ~ 200 μ L 用) で試験管に取り、それぞれにフェニトロチオン酵素標識物試液 150 μ L をマイクロピペット (50 ~ 200 μ L 用) 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 (50 ~ 200 μ L 用) 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 $^{\circ}$ 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。

ウェルの底に洗浄試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 (50 ~ 200 μ L 用) で発色試薬 100 μ L を加えて室温 (15 ~ 25 $^{\circ}$ 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 (50 ~ 200 μ L 用) で添加して下さい。

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。

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。

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。

フェニトロチオン標準試液の濃度に対し吸光度をプロットし、検量線を作成します。

“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。

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。

3) 試料中のフェニトロチオン濃度の計算

フェニトロチオン標準試液による吸光度の平均値を求め、片対数方眼紙の横軸にフェニトロチオン濃度 (X) を、縦軸にそれに対応する吸光度 (Y) をプロットして検量線を作成します。この検量線に試料の吸光度の平均値をあてはめ、試料中のフェニトロチオン濃度 (単位は ppb) を求めます。ただし、X は対数です。一例を第 1 図に示します。

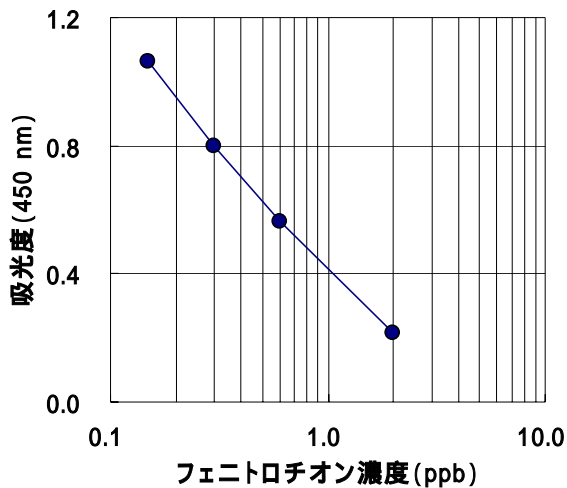
検量線は、測定実験ごとに作成して下さい。

試料の測定は、検量線範囲内の濃度 (0.15 ~ 2 ppb) で行って下さい。2 ppb を超える高濃度の試料の場合は、精製水で希釈した後、再測定してください。また、0.15 ppb 以下の試料を測定される場合は、固相抽出による濃縮を行ってください。

単位 ppb は part per billion の略で、10 億分の 1 を表します。

10. 注意事項

使用前に、取扱説明書等をよくお読みいただき、注意事項をお守り下さい。
 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下さい。
 試薬類は冷蔵庫(2~8℃)で保存して下さい。
 フェニトロチオンを含む廃液及び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下さい。
 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下さい。
 開封後は、各容器を密封し、取扱説明書と共に保管して下さい。
 保管・廃棄する場合には、衛生面、環境面に十分配慮し、法規を遵守して下さい。
 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下さい。



第1図 検量線例

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 類縁化合物との交差反応性

農薬	商品例	交差反応性(%)
フェニトロチオン	スミチオン	100
EPN	EPN	34.0
パラチオン	失効	12.0
パラチオンメチル	失効	6.9
フェニトロ(MEP)オクソン		1.0
シアノホス(CYAP)	サイアノックス	0.9
EPN オクソン		<0.1
フェンチオン(MPP)	バイジット	<0.1
ジクロロフェンチオン(ECP)	VC	<0.1
ダイアジノン	ダイアジノン	<0.1
イソキサチオン	カルホス	<0.1
クロルピリホス	ダースバン	<0.1
クロルピリホスメチル	レルダン	<0.1
フェンエート(PAP)	エルサン	<0.1
クロルフェンピホス	ビニフェート	<0.1
スルプロホス	ボルスタール	<0.1
プロチオホス	トクチオン	<0.1
プロバホス	カヤフォス	<0.1
プロフェノホス	エンセダン	<0.1

9. 貯法・有効期間

貯法 : 遮光して2~8℃に保存します。
有効期間 : 製造日から6箇月です。

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 (フェニトロチオン)

測定範囲の設定 (高感度フェニトロチオン)

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 で保管してあるキット用抗体プレートを30分間25 に静置して、使用した。

1-3-2. 酵素標識物試液の調製

4 で保管してあるキット用酵素標識物試薬を30分間25 に静置した。

蒸留水6mLで溶解し、酵素標識物試液とした。

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、10ppmの検量線用標準液を調製した。

検量線用標準液を3倍希釈で表に示すように希釈列を調製した。

検量線溶液の調製 (3倍希釈)

	1	2	3	4	5	6	7
検量線用標準液 (ppm)	3.3	0.3667	0.1222	0.0407	0.0136	0.0045	0
希釈後 (ppb)	33	3.667	1.222	0.407	0.136	0.045	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 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

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0.15 ppb、及びB/Bo=0.2付近の濃度 (測定上限 ; H) として
2 ppbを選定して、測定範囲上限および下限に設定した。

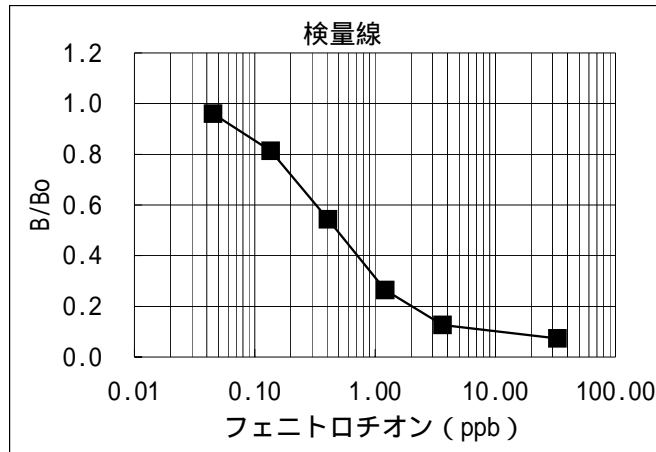


図1. フェニトロチオン検量線 (B/Bo表示)

2. 有意差検定

2-1. 目的

設定した測定範囲の下限値 (0.15 ppb) と上限値 (2 ppb) のBo及び農薬過剰量に対する有意差を確認する。

2-2. 材料

高感度フェニトロチオン測定キット

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 µL/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 µL/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 µL/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。

2-4. 結果

表1-1.

BoとLとの間の有意差検定

	Bo	L
平均	1.16425	0.9315
分散	0.00282593	0.00037171
観測数	8	8
プールされた分散	0.00159882	
仮説平均との差異	0	
自由度	14	
t	11.6417885	
P(T<=t) 片側	6.8937E-09	
t 境界値 片側	1.76130925	
P(T<=t) 両側	1.3787E-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	農薬過剰量
平均	0.214625	0.039625
分散	0.00023141	7.9411E-05
観測数	8	8
プールされた分散	0.00015541	
仮説平均との差異	0	
自由度	14	
t	28.0755043	
P(T<=t) 片側	5.2027E-14	
t 境界値 片側	1.76130925	
P(T<=t) 両側	1.0405E-13	
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と農薬過剰量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（フェニトロチオン）

再現性（高感度フェニトロチオン）

1. 目的

キットの再現性（同時、日間）を確認する。

2. 材料

高感度フェニトロチオン測定キット

玄米

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

	高	中	低
標準液（ppm）	0.6	0.4	0.3

3-2. 測定試液の調製

玄米

磨碎：玄米をミキサーで粉末にした。

粉末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0.25mL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 ppm	粉末中農薬濃度 ppm	抽出・希釈後濃度 ppb
A	0.6	0.030	0.59
B	0.4	0.020	0.39
C	0.3	0.015	0.29

遠沈管のふたを閉め、よく振った。

3時間 風乾して、メタノールをとばした。

蒸留水 各5mL加えて混合し、30分間静置した。

メタノール 各25mLを加えた。

振とう機（120回/分）で30分間振とうした。

5分間静置後、無灰パルプ（0.3～0.4g）を詰めたシリンジでろ過した。
この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100mL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 で保管してあるキットを取り出し、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、溶解して標準試液とした。

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 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

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	0.90	0.57	0.39
2	0.88	0.50	0.35
3	0.88	0.48	0.39
4	0.86	0.47	0.37
5	0.95	0.49	0.35
6	0.91	0.56	0.34
平均	0.90	0.51	0.37
標準偏差	0.03	0.04	0.02
変動係数(%)	3.3	8.6	6.2

表2-2. 日間再現性

	測定値 (ppb)		
	試料 A	試料 B	試料 C
1日目	1.00	0.58	0.37
2日目	0.90	0.51	0.37
3日目	0.89	0.48	0.37
平均	0.93	0.52	0.37
標準偏差	0.06	0.05	0.01
変動係数(%)	6.7	9.7	1.4

5. 考察

米の粉砕試料にフェニトロチオンを添加した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及び2-2に示すとおりで、同時再現性は変動係数3.3~8.6%、日間再現性は変動係数1.4~9.7%とともに良好であった。

保存安定性試験（高感度フェニトロチオン）

1. 目的

キットの8における保存安定性を確認する。

2. 材料

高感度フェニトロチオン測定キット：2ロット

3. 方法

3-1. キットの調製

8 保存キットを30分間25℃に静置した。

キット用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。

キット用標準試薬に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 µL/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 µL/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 µL/well分注した。

測定（450nm）

測定機：スマートリーダー

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	30	60	120	180	240
Bo	吸光度	1.266	1.339	1.375	1.231	1.289	1.388
	SD	0.077	0.066	0.032	0.053	0.063	0.042
	CV(%)	6.1	4.9	2.3	4.3	4.9	3.0
	相対値	100.0%	105.8%	108.5%	97.2%	101.8%	109.6%
標準品L	吸光度	0.942	1.044	1.118	1.026	1.022	1.101
	B/Bo	0.744	0.779	0.814	0.834	0.793	0.793
	SD	0.064	0.077	0.020	0.056	0.029	0.025
	CV(%)	6.8	7.4	1.8	5.5	2.8	2.3
	相対値	100.0%	104.8%	109.4%	112.1%	106.7%	106.7%
標準品H	吸光度	0.227	0.251	0.263	0.223	0.223	0.243
	B/Bo	0.179	0.188	0.191	0.181	0.173	0.175
	SD	0.008	0.009	0.007	0.018	0.021	0.008
	CV(%)	3.3	3.4	2.8	7.9	9.6	3.4
	相対値	100.0%	104.9%	107.0%	101.4%	96.7%	97.9%
Boコントロール	吸光度	1.409	1.423	1.435	1.472	1.445	1.532
	SD	0.065	0.043	0.013	0.097	0.102	0.025
	CV(%)	4.6	3.0	0.9	6.6	7.0	1.6
	相対値	100.0%	101.0%	101.8%	104.5%	102.5%	108.7%

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	30	60	120	180	240
Bo	吸光度	1.046	1.086	1.202	1.195	1.082	1.094
	SD	0.076	0.070	0.040	0.024	0.036	0.046
	CV(%)	7.3	6.5	3.3	2.0	3.3	4.2
	相対値	100.0%	103.9%	114.9%	114.3%	103.4%	104.7%
標準品L	吸光度	0.743	0.859	0.862	0.939	0.857	0.873
	B/Bo	0.710	0.791	0.717	0.785	0.792	0.798
	SD	0.039	0.088	0.017	0.035	0.057	0.012
	CV(%)	5.2	10.3	2.0	3.8	6.7	1.4
	相対値	100.0%	111.3%	101.0%	110.5%	111.5%	112.3%
標準品H	吸光度	0.210	0.210	0.204	0.219	0.221	0.221
	B/Bo	0.200	0.193	0.169	0.183	0.204	0.202
	SD	0.019	0.014	0.012	0.018	0.018	0.016
	CV(%)	8.8	6.5	5.9	8.3	8.3	7.2
Boコントロール	吸光度	1.107	1.231	1.159	1.196	1.240	1.328
	SD	0.047	0.046	0.038	0.054	0.137	0.014
	CV(%)	4.3	3.7	3.3	4.5	11.1	1.0
	相対値	100.0%	111.2%	104.7%	108.0%	112.0%	119.9%

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8 240日保存で相対値の変動が20%以内であるので、本キットは6ヶ月使用可能である。

なお、保存試験は継続中である。

交差反応性（高感度フェニトロチオン）

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

高感度フェニトロチオン測定キット（標準試薬は除く）

対象農薬の標準品

- 1 フェニトロチオン (MEP)
- 2 EPN
- 3 パラチオン
- 4 パラチオンメチル
- 5 フェニトロ (MEP) オクソン
- 6 シアノホス (CYAP)
- 7 EPNオクソン
- 8 フェンチオン (MPP)
- 9 ジクロフェンチオン (ECP)
- 10 ダイアジノン
- 11 イソキサチオン
- 12 クロルピリホス
- 13 クロルピリホスメチル
- 14 フェンエート (PAP)
- 15 クロルフェンビンホス
- 16 スルプロホス
- 17 プロチオホス
- 18 プロパホス
- 19 プロフェノホス

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 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 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

3-4. 交差反応性の算出

測定結果から IC_{50} 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 (%) = IC_{50} 値 (フェニトロチオン) / IC_{50} 値 (対象農薬) \times 100

4. 結果

表4 交差反応性一覧

農薬	交差反応性(%)
フェニトロチオン (MEP)	100
EPN	34
パラチオン	12
パラチオンメチル	6.9
フェニトロ (MEP) オクソン	1.0
シアノホス (CYAP)	0.9
EPNオクソン	<0.1
フェンチオン (MPP)	<0.1
ジクロフェンチオン (ECP)	<0.1
ダイアジノン	<0.1
イソキサチオン	<0.1
クロルピリホス	<0.1
クロルピリホスメチル	<0.1
フェンエート (PAP)	<0.1
クロルフェンビンホス	<0.1
スルプロホス	<0.1
プロチオホス	<0.1
プロパホス	<0.1
プロフェノホス	<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に示すとおりであった。
本キットはEPNに強い交差反応性を示し、さらにパラチオン、メチルパラチオンなど、
構造類似物質にも反応性をもつことが確認された。

添加回収試験（高感度フェニトロチオン）

1. 目的

農産物に添加したフェニトロチオンの回収率を確認する。

2. 材料

高感度フェニトロチオン測定キット

玄米

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)	0.6	0.4	0.3

3-2. 測定試液の調製

米試料

磨砕：玄米をミキサーで粉末にした。

粉末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0.25mL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	粉末中農薬濃度	抽出・希釈後濃度
	ppm	ppm	ppb
A	0.6	0.030	0.59
B	0.4	0.020	0.39
C	0.3	0.015	0.29

遠沈管のふたを閉め、よく振った。

3時間 風乾して、メタノールをとばした。

蒸留水 各5mL加えて混合し、30分間静置した。

メタノール 各25mLを加えた。

振とう機（120回/分）で30分間振とうした。

5分間静置後、無灰パルプ（0.3～0.4g）を詰めたシリンジでろ過した。
この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17mL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 で保管してあるキットを取り出し、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、溶解して標準試液とした。

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 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

付録 3 : 参考となるその他の文書やデータ (フェニトロチオン)

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。

特開 2000-219695 「フェニトロチオンのハプテン化合物、抗体及び測定法」

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。

本キットは農作物中の残留農薬測定用に開発したものであるが、フェニトロチオンは「水道法水質管理目標設定項目の対象 (目標値 0.003mg/L)」や、「ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止に係る暫定指導指針値 (2mg/L)」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。

品質管理システム (E L I S A 測定用)

目次

1 . 機器・器具保守管理標準作業手順	1
1 - 1 マイクロプレートリーダー保守管理標準作業手順.....	2
(1) 使用時点検マニュアル.....	2
(2) 定期点検マニュアル	2
1 - 2 マイクロプレートウォッシャー保守管理標準作業手順.....	3
(1) 使用時点検マニュアル.....	3
(2) 定期点検マニュアル	3
1 - 3 マイクロピペット保守管理標準作業手順	4
(1) 使用時点検マニュアル.....	4
(2) 定期点検マニュアル	4
1 - 4 冷蔵庫保守管理標準作業手順.....	5
(1) 使用時点検マニュアル.....	5
・機器・器具等使用時点検記録簿 (様式 1)	6
・機器・器具等定期点検記録簿 (様式 2)	8
2 マイクロプレートリーダーの標準作業手順	9
2 - 1 分析システム	9
2 - 2 マイクロプレートリーダーの操作	9
3 試験操作手順	10
3 - 1 一般的な (共通) 事項.....	10
・分析作業台帳 (様式 3)	11
3 - 2 標準測定手順 (例)	12

1 機器・器具保守管理標準作業手順

使用する機器・器具類は、以下の管理番号を付し、保守管理標準作業手順（SOP）に従って保守管理を行う。

機械・機具類	SOP . No	管理番号
マイクロプレートリーダー（TECAN 社製サンライズリモート）	SOP-1	SOP-1-1
マイクロプレートウォッシャー（TECAN 社製 コンパ スウォッシャー）	SOP-2	SOP-2-1
マイクロピペット（10-100 μ L）（エッペンドルフ社製）	SOP-3	SOP-3-1
マイクロピペット（20-200 μ L）（エッペンドルフ社製）	"	SOP-3-2
マイクロピペット（100-1000 μ L）（エッペンドルフ社製）	"	SOP-3-3
マルチチャンネルマイクロピペット（エッペンドルフ社製）	"	SOP-3-4
冷蔵庫（ナショナル NR-B43A-W）	SOP-4	SOP-4-1

1 - 1 マイクロプレートリーダー保守管理標準作業手順 (SOP-1)

マイクロプレートリーダーは、定期的な校正を行って適正な測定精度が担保されたものを使用する。

通常の使用にあたっては、以下の使用時点検を実施し、正常であることを確認した後使用する。

(1) 使用時点検マニュアル

使用者は使用時点検マニュアルに従って点検し、使用時点検記録簿(様式1)に記入する。

【使用時点検マニュアル】

点検項目	点検方法	管理基準等	処置等
外観・プレート設置台	目視により外観・プレート設置台の汚れ・ほこりがないことを確認する	外観・プレート台に汚れ・ほこりがないこと	清掃
光源ランプ	光源ランプの光量は十分か	光源ランプの光量(立ち上げ時自動診断)	修理・交換
フィルター	フィルターの劣化はないか	フィルターの劣化がないこと(立ち上げ時自動診断)	修理・交換

【使用時点検記録簿記入方法】

判定には、良好を○、不良を×と記入する。

不良の場合は正常な状態になるように処置し、処置内容を記す。

(2) 定期点検マニュアル

定期的に点検を業者に依頼し、機器の校正を行う。

【定期点検記録簿記入方法】

業者の点検項目・修理箇所を記録簿(様式2)に記入する。

バリデーション結果報告書は、記録簿とともに保存する。

1 - 2 マイクロプレートウォッシャー標準保守管理作業書 (SOP-2)

使用にあたっては、以下の使用時点検を実施し、正常であることを確認した後使用する。

(1) 使用時点検マニュアル

使用者は使用時点検マニュアルに従って点検し、使用時点検記録簿(様式1)に記入する。

【使用時点検マニュアル】

点検項目	点検方法	管理基準等	処置等
外観・プレート設置台	目視で損傷・汚れがないことを確認する	目視で損傷・汚れがないこと	清掃
配管	配管チューブ・ノズルに塩類の結晶等の詰まり・汚れがないか	結晶等の詰まり・汚れがないこと	洗浄・交換
	配管チューブからの液漏れはないか	液漏れがないこと	修理・交換
動作確認	空のマイクロプレートを設置して動作確認をする	洗浄液がウェルに均等に分注されること	点検修理

【使用時点検記録簿記入方法】

判定には、良好を○、不良を×と記入する。

不良の場合は正常な状態になるように処置し、処置内容を記す。

(2) 定期点検マニュアル

定期的に業者による点検を受ける。

【定期点検記録簿記入方法】

業者の報告書により点検項目・修理箇所を記録簿(様式2)に記入する。

バリデーション結果報告書は、記録簿とともに保存する。

1 - 3 マイクロピペット標準保守管理作業書 (SOP-3)

マイクロピペットは、定期的に校正を行って適正な測定精度が担保されているものを使用する。
通常の使用にあたっては、以下の使用時点検を実施し、正常であることを確認した後使用する。

(1) 使用時点検マニュアル

使用者は、使用時点検マニュアルに従って点検し、使用時点検記録簿に記入する。

【使用時点検マニュアル】

点検項目	点検方法	管理基準等	処置等
外観	ノーズコーンに汚れ、詰まりはないか	汚れ・詰まりがないこと	清掃
ピストンの動き	ピストンの動きはスムーズか	ピストンの動きはスムーズであること	ピストンの清掃及びグリースの塗布
チップからの液漏れ	チップからの液漏れはないか	チップからの液漏れがないこと	ピストンとピストンシールの点検・交換

【使用時点検記録簿記入方法】

判定には、良好を○、不良を×と記入する。

不良の場合は正常な状態になるように処置し、処置内容を記す。

(2) 定期点検マニュアル

定期的にバリデーションをうける。

【定期点検記録簿記入方法】

定期点検簿（様式3）に記入するとともにバリデーション証明書を保存する。

1 - 4 冷蔵庫の標準保守管理作業書 (SOP-4)

(1) 使用時点検マニュアル

使用者は使用時点検マニュアルに従って点検し、使用時点検記録簿に記入する。

【使用時点検マニュアル】

点検項目	点検方法	管理基準等	処置等
外観・庫内の 汚れ	目視により損傷・汚れはないか	目視により損傷汚れがないことを確認する	汚染 清掃 損傷 修理
温度表示	目視と温度測定 (温度測定装置)	設定温度と表示温度が ±2.5 以内であること	不良の場合 は調製、修理 を依頼する
扉	開閉を行う	完全に開閉でき、異物 等により妨げられてい ないこと	異物等を取 り除く

【使用時点検記録簿記入方法】

判定には、良好を ○、不良を × と記入する。

不良の場合は正常な状態になるように処置し、処置内容を記す。

機器・器具等使用時点検記録簿（様式1）

____年 月 日

マイクロプレートリーダー 管理番号 SOP-1-1 機種・形式 _____

- 外観に汚れがない
- プレート台に汚れ・ほこりがない
- 光源ランプの光量不足がない（自己診断）
- フィルターの劣化がない（自己診断）

不良箇所の処置内容

点検者 _____

マイクロプレートウォッシャー 管理番号 SOP-2-1 機種・形式 _____

- 目視で汚れ・損傷がない
- 配管チューブ・ノズルに詰まり・汚れがない
- 配管チューブからの液漏れがない
- 空プレートによる動作確認

不良箇所の処置内容

点検者 _____

マイクロピペット

管理番号 SOP-3-1
(10-100 μ L)

- ノーズコーンに汚れ・詰まりがない
- ピストンの動きはスムーズか
- チップからの液漏れがない

管理番号 SOP-3-2
(20-200 μ L)

- ノーズコーンに汚れ・詰まりがない
- ピストンの動きはスムーズか
- チップからの液漏れがない

管理番号 SOP-3-3
(100-1000 μ L)

- ノーズコーンに汚れ・詰まりがない
- ピストンの動きはスムーズか
- チップからの液漏れがない

管理番号 SOP-3-4
(30-300 μ L)

- ノーズコーンに汚れ・詰まりがない
- ピストンの動きはスムーズか
- チップからの液漏れがない

不良箇所の処置内容

点検者 _____

冷蔵庫

管理番号 _____

機種・形式 _____

外観・庫内の汚れはないか

ファンの作動は正常か

温度表示は設定範囲内か

扉の開閉は正常か

不良箇所の処置内容

点検者 _____

冷蔵庫

管理番号 _____

機種・形式 _____

外観・庫内の汚れはないか

ファンの作動は正常か

温度表示は設定範囲内か

扉の開閉は正常か

不良箇所の処置内容

点検者 _____

機器・器具等定期点検記録簿（様式2）

管理番号：

機種・形式： _____ 管理担当者 _____

点検年月日	点検事項
	点検者： 確認者：
	点検者： 確認者：
	点検者： 確認者：

（注）点検報告書及び校正証明書を綴じ込んで保存すること。

2 マイクロプレートリーダーの標準操作手順

2 - 1 分析システム

対象化学物質の測定には、以下の ELISA 測定システムを使用する。

マイクロプレートリーダー： サンライズリモート

（TECAN 社製）

解析ソフトウェア： LS-PLATEmanager 2004

（和光純薬（株）製）

2 - 2 マイクロプレートリーダーの操作

本体起動

LS-PLATEmanager 起動

ファイルの新規作成

測定パラメータの設定

検体の配置

測定開始（マイクロプレートをセット）

測定終了

レポート印刷

データに名前を付けて保存

3 試験操作手順

3 - 1 一般的な事項

(1) 試験室の管理

- ・室温は、試験品の取扱説明書の指示に従って管理する。
- ・試料の前処理を行う室は、試験品の測定を行う室とは別の室で行う。

(2) 試験方法

- ・試験品の取扱説明書の試験方法を習熟し、取扱説明書指定の方法を厳守する。
- ・取扱説明書の特記事項には、十分注意して操作する。

(3) 試験時の注意

ア．試験品の有効期限

- ・有効期限には十分注意し、有効期限を過ぎたものは使用しない。

イ．試薬温度の管理

- ・保管していた温度から室温に戻すときは、確実に室温に戻っていることを確認する。
- ・試薬の温度管理は、取扱説明書の指示に従って管理する。

ウ．マイクロピペットの取扱い

- ・チップは確実に取り付ける。
- ・マイクロピペットの取扱いは慎重に行い、試料の持ち越しがないように十分注意する。
- ・試料を替える際は、試料毎に確実にチップを交換する。

エ．汚染防止措置

- ・汚染を防止するために、ディスポーザブル・グローブを使用する。
- ・グローブは、高濃度の標準溶液（原液）を取り扱った時又は汚染の可能性があるときは、必ず新しいグローブに替えて次の操作に移る。

エ．反応時間の厳守

- ・反応時間・発色時間は、取扱説明書の時間を厳守し、試料によってばらつきが生じないように、ストップウォッチ等を用いて計測する。
- ・反応溶液と反応停止溶液を加えるときは、加えるウェルの順番を同じにし、作業手順を一定にする。

オ．標準液の取扱い

- ・標準溶液系列を取り扱う時は、低濃度域から順次取り扱う。

カ．分析作業台帳

- ・分析作業にあたっては、分析作業台帳（様式3）により、分析条件及び標準溶液・分析試料の数及び配置を記録・管理する。

キ．その他

- ・異なるキットの試薬を組み合わせ使用しない。

分析作業台帳(様式3)

分析作業名： _____

実施者： _____

____年 ____月 ____日 開始時刻 _____ 室温 _____ 、 終了時刻 _____ 室温 _____

使用機器等(管理番号を記入する)

マイクロプレートリーダー： _____、 プレートウォッシャー： _____

マイクロピペット： _____、 _____、 _____、 _____、 _____、

冷蔵庫： _____

使用した ELISA キット・試薬

識別 No： _____、 ELISA キット名： _____ Lot.No.: _____

試薬：

サンプル

配置図

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

3 - 2 試験標準作業書

(ELISA キットによって、使用する試薬、器具並びに装置は異なっている。市販キットの1例について示す。)

フェニトロチオン

1 試薬

メタノール 残留農薬試験用 (和光純薬工業)
フェニトロチオン標準品 (和光純薬工業)
試薬 (キット)

2 器具及び装置

(1) マイクロピペット及びチップ

設定した容量を精度良く分取できるもの。

(2) マルチチャンネルピペット (300 µL)

設定した容量を精度良く分取できるもの。

(3) 試薬リザーバー

(4) ディスポーザブルガラス試験管

(5) マイクロプレートシール

(6) 混合用マイクロプレート

(7) ディスポーザブル滅菌シャーレ

(8) SPC 栓ガラス瓶 (100mL、250mL)

(9) ペーパータオル

(10) マイクロプレートウォッシャー

96 ウェルマイクロプレートの各ウェルの洗浄ができるもの。

(11) マイクロプレートリーダー

96 ウェルマイクロプレートの各ウェルの吸光度を測定できるもの。

(12) データ解析用コンピューター及び解析ソフトウェア

検量線の回帰式 (4パラメーター、多項式等) の作成及び試料の濃度を算出できるもの。

3 操作

フローチャート 測定時間約 3 時間 (試薬を室温に戻す時間含む)

定量範囲 : 0.15 - 2.0 µg/L

準備 試験用プレート及び試薬類を室温に戻す

BPA 標準液の調製 添付のフェニトロチオン標準原液を希釈し、10%メタノール溶液で標準液を調製する
調製濃度 : 5 系列 (2.0, 0.6, 0.3, 0.15, 0 µg/L)

混合液の調製	試料溶液またはフェニトロチオン標準液 60 μ L と酵素標識物試薬 60 μ L を混合用マイクロプレートで混合
抗原抗体反応	抗体固相化プレートに で調製した混合液 100 μ L を加え、室温（18～25 ）で 60 分間反応
洗浄液の調製・洗浄	濃縮洗浄液を精製水で 10 倍に希釈する（最終液量：500mL） 洗浄液 300 μ L でウェルを 3 回洗浄する 洗浄後はペーパータオル上で充分水分を除去する。
発色反応	発色試薬 100 μ L をウェルに加え、室温（18～25 ）で 10 分間反応させる
反応停止	反応停止液 100 μ L をウェルに加える
比色・濃度計算	マイクロプレートリーダーを用い、波長 450nm で吸光度を測定し、標準曲線から試料中の濃度を計算 （解析ソフトは使用説明書に従う）

注意事項：取扱説明書の特記事項を遵守する。

付録4

品質管理システム 機器分析（フェニトロチオン）

はじめに	1
1 一般規定（その1）	2
1 - 1 試料採取地点の選定	2
1 - 2 水質試料採取	2
1 - 3 運搬・保存方法	3
1 - 4 試料調製	3
1 - 5 野外及び試料に関するデータの記録	3
2 一般規定（その2）	6
2 - 1 前処理操作と機器測定	6
2 - 2 測定値の品質管理と評価	9
3 水試料中フェニトロチオンの測定に関する 標準作業手順書（SOP）	15
3 - 1 分析法の概要、試薬類、器具および装置	15
3 - 2 水質試料の抽出法	15
3 - 3 測定用試料溶液の調製	15
3 - 4 空試験液の調製	16
3 - 5 標準液の調製	16
3 - 6 GC / MS測定	16
4 品質管理報告書	17
* 分析精度管理総括表	18

はじめに

機器分析は、一般環境における試料採取、運搬、保存処理、機器分析のための抽出、濃縮、精製等の前処理、測定機器の調整、標準試料測定、試料測定、データ処理及び結果報告までの一連の作業、操作から成っており、これらについて表1に示す手法により、分析精度管理を実施する。

1. 一般的規定（その1）

水質試料の採取、運搬及び調製に係る一般的な考え方、手順、方法について示す。これらに留意し、適切な地点と時期を選定し、代表性のある試料採取を行い、調査媒体と測定対象物質に変質がないように運搬、調製する。

1 - 1 試料採取地点の選定

試料採取にあたっては、特定の発生源の影響を受けない一般的な環境を対象として地点を選定する。この際、測定結果を評価する上で参考となる水文、気象、土地利用等のデータが利用できる地点があれば、それを優先する。

1 - 2 水質試料採取

(1) 採水時期

原則として、比較的晴天が続き、水質が安定している日を選定する。感潮域の場合には、海水の影響の少ない干潮時を採水時間帯とする。

(2) 採水部位

表層水の採取を基本とし、河川では原則として流心で採水する。表層は水深の1/5程度までの層であり、通常、水面下0～数10cmを採取する。水深がごく浅い地点においては底泥の巻き上げによる混入がないよう注意深く採水する。また、水面に浮遊ごみや浮遊油脂類が目視される場合には、これらが混入しないように、0～2cm層を避けて採水する。

(3) 採水器具

採水器具は、地点の状況に応じ、バケツ、柄付きの採水器（ひしゃく）、ハイロート採水器、バンドーン採水器を用いる。器具の材質としては、ステンレス製、合成樹脂製があるが、測定対象物質や測定を妨害する物質が溶出しない材質で、かつ、測定対象物質が内壁に付着しにくい材質のものを使用する。

当実証事業では、測定対象物質が有機物質であるため、採水器具は合成樹脂製でないステンレス製のバケツまたはひしゃくを使用する。採水器具は事前に洗剤で洗浄後、十分に水道水で水洗しておく。また、バケツにつけるロープは麻製のものを使用する。

なお、現地で採取する水面に容易に近づける場合は、試料容器を素手で持ち、直接、試料水を採取する。

(4) 試料容器

試料容器は、運搬・保管時の汚染や損失がないようなものを、測定対象物質ごとに準備する。

当実証事業では、容量4Lで四フッ化エチレン樹脂フィルムで密閉できる褐色のガラス製ネジ口瓶を使用する。容器は使用の当日までに水洗、乾燥を済ませ、清浄な保管庫に保管しておいたものを、当日、残留農薬測定用のアセトン及びヘキサンで洗浄し、乾燥させたのち、密栓したものを使用する。

なお、一般項目測定用の試料容器はポリエチレン製の容器で、事前に水道水で水洗後、精製水でゆすいだものを使用する。

(5) 採水操作

採取場所の状況から、測定対象物質に適した採水器具、または試料容器そのものを用いて表層水を採取する。採水器具は、表層水で3回共洗いした後、採水し、試料とする表層水を試料容器に移し入れ、満水にして密栓する。

なお、試料容器の内壁への吸着が想定される疎水性有機物質（水溶解度：1 mg / L以下）等が測定対象となる場合には、試料容器の共洗いは行わない。

測定対象物質の安定化のために、還元剤や酸の添加、あるいはサロゲート標準物質の添加が必要な場合には、各物質の分析に係る標準作業手順(SOP)に従って、適切に処理する。農薬を測定対象とする試料については、残留塩素が存在する場合、残留塩素1 mg 当たりL(+)-アスコルビン酸溶液(40 g/L) 0.1 mlの割合で添加する。採水操作に併せて、水温、気温、外観、色相、臭気、夾雑物、油膜の有無等の水質に係る基本事項を記録する。

1 - 3 運搬・保存方法

採取した試料は、汚染のない適切な運搬容器に入れて、遮光・保冷状態で試験施設まで運搬する。

試験施設に到着後、できるだけ速やかに試料の調製を行い、分析に供する。やむを得ず保存が必要な場合は、試料を汚染することのない冷暗所(4℃以下)で保存する。

1 - 4 試料調製

水質試料は、原則として懸濁物質を含む試料を分析する。

1 - 5 野外及び試料に関するデータの記録

試料採取の際には野外データを、試験施設に搬入時には試料データを測定し、表2の「現地調査（試料採取）記録表」に記録する。

(1) 野外データ

試料採取の際には、野帳に次の野外データを記録する。

- ・採取日時、採取担当者名
- ・採取地点の名称、正確な位置（地図）、一般環境状態、周辺施設（略図）
- ・気象条件（気温、天候）
- ・外観（濁り、臭気、色相、夾雑物）
- ・現場測定を行った項目の結果（水温、pHなど）
- ・試料の安定化処理の方法
- ・運搬・保存の条件

(2) 試料データ（一般項目）

試料の一般的性状を示す試料データは、測定の目的に応じて分析結果の評価に必要な項目について、試験施設に持ち帰った直後またはできるだけ速やかに、ポリエチレン製容器の試料を用いて測定し、記録する。

表1 試料採取から分析結果報告までのフローと品質管理

段階	事項	主な精度管理の方法	品質管理のための書面による記録
事前準備及び 試料採取	試料採取地点の選定	一般的規定（その 1）に従い実施	現地調査記録表
	試料採取時期		
	試料採取部位		
	採取器具の準備		
	容器の準備		
	試料採取操作		
	運搬・保存方法		
	野外データの記録		
	試料データ（一般項目）の記録		
	試料の前処理		
標準溶液の調製			
サロゲート溶液の調製			
クリーンアップ・スパイクの調製			
シリンジ・スパイクの調製			
サロゲート溶液添加			
クリーンアップ・スパイクの添加			
抽出操作			
クリーンアップ操作			
濃縮操作			
G C / M S 測定	シリンジ・スパイクの添加	一般的規定（その 2）及びS O P に従い実施	装置検出下限値（IDL）の算定記録表 検出下限値（MDL）及び定量下限値（MQL）の算定記録表 分析精度管理総括表
	G C / M S の最適化		
	測定条件の検討		
	検量線の作成		
	I D L		
	M D L		
	定量下限値		
	空試験		
	添加回収試験		
	二重測定による試料測定		
トラベルブランク測定			
分析結果	操作ブランク測定	S O P に従い実施	分析精度管理総括表
	データ処理		
	定量計算		
	分析結果報告		
		品質管理報告書	

表2 現地調査（試料採取）記録表

分析対象物質名			
採取日時		年 月 日 (時 分 ~ 時 分)	
採水河川名等			
採取地点名			
採水部位		表層 ・ その他 ()	
採水担当者名			
採水担当者所属			
採水器具		バケツ・ヒシャク・バンドーン採水器・試料容器直接・その他 ()	
採取器具の材質		ステンレス・プラスチック・その他 ()	
試料容器		褐色ガラス試薬瓶 (容量 L)	
試料容器本数		分析用 (本) ・ 予備 (本) ・ トラベルブランク用 (本)	
共洗い操作		有り (回) ・ 無し	
安定化処理の有無		有り ・ 無し	
安定化処理操作		添加物質名 () 添加量 (g)	
トラベルブランク操作		有り ・ 無し	
一般項目用試料容器		ポリ瓶 (容量 L) × (本)	
天候			
気温		()	
水温		()	
水深		(m)	
流速			
外観	濁り		
	臭気		
	色相		
	夾雑物		
	油膜の有無	有り ・ 無し	
現場測定	pH		
	DO		
	残留塩素		
水質	SS		
	BOD		
	COD		
試料運搬方法			
試料運搬時の保存方法		クーラーボックス (氷冷) その他 ()	
試料搬入時刻		(時 分)	
分析までの保管方法		試料庫 () そ 他 ()	
現場記録	略図	有り ・ 無し	
	周辺写真	有り ・ 無し	
現場情報	地形図	有り ・ 無し	
	潮汐表	有り ・ 無し	

(現場略図)

2. 一般的規定（その2）

測定データの品質を維持するため、使用する器具類、試薬類等を適切に管理し、細心の注意をはらって使用することにより、操作ブランクを可能な限り低減させるよう配慮する。また、測定機器を適正に維持管理し、性能評価を行った上で、測定条件を決定し、再現性のある測定を確保する。

2 - 1 前処理操作と機器測定

(1) 標準溶液

測定値は、採取試料と標準物質の分析結果を比較することにより得られるが、その結果の信頼性を確保するため、可能な限りトレーサビリティの保証された標準物質を使用する。これらの標準物質、標準溶液については、メーカー名、規格、容量、LOT番号、有効期限、開封年月日、使用の経歴、使用者名を表3の「標準物質（標準溶液）記録表」に記録しておく。

標準物質の保存方法は、メーカー指定の条件により行い、標準溶液の調製方法、調製した標準溶液の保存方法は各物質の分析に係る標準作業手順（SOP）に従う。

(2) 前処理操作

試料を分析するに際して、抽出、精製、濃縮等の適切な前処理操作が必要であり、これらの操作の出来不出来が分析結果に大きく影響するので、予め、各物質の分析に係る標準作業手順（SOP）に記載された添加回収試験液を用いて試験を行い、回収率とその再現性を確認しておく。

添加回収試験における許容限度は回収率で80～120%、サロゲート標準物質の回収率で50～120%とし、これを逸脱している場合はその原因を究明し、許容限度内に収まるように前処理操作の改善を行う。

また、操作ブランクの有無と程度を確認し、有の場合には、それが極力小さくなるように前処理操作の改善を行う。

(3) 分析装置の最適化

使用する分析機器は、試料の測定が可能になるよう測定条件を設定し、調整しておく。この際、感度とその直線性、安定性等の他、測定の誤差となる干渉の有無や大きさ、その補正機能等について、信頼できる分析が可能かどうか確認しておく。

分析機器の最適化及び測定条件は、各物質の分析に係る標準作業手順（SOP）に従い設定する。

分析機器の感度は装置検出下限値（IDL；Instrument Detection Limit）で評価する。検量線作成用標準液の最低濃度のもの、または、シグナル/ノイズ（S/N）比で5～15程度の濃度の標準液を5回以上（通常7回とする）繰り返して測定し、得られた測定値から標準偏差を求め、IDLを算定する。

さらに、試料量、最終前処理液量、分析装置導入量等から、IDLの試料換算値を求め、この値が目標とする検出下限値以下であることを確認する。

IDL算定は以下に示す手順により行い、結果を表4の「装置検出下限値（IDL）の算定記録表」に記録する。

なお、測定データ等IDL算定に係るデータはすべて記録、保管しておく。

・ 水質における装置検出限界 (IDL) の算定手順

Step-1 装置の最適化

測定装置 (分析システム) を対象物質の分析に最も適した条件に設定及び調整する。

< 設定及び調整項目の例 >

MSのチューニング、カラム条件、昇温条件、注入口圧力等各物質の分析に係る標準作業手順に従い設定及び調整する。

Step-2 検量線の作成

検量線を以下の手順で作成する。

< 検量線作成の例 >

1 µg/ml 標準溶液を作成し、内標準添加 測定 ピーク検出 5 ~ 10 倍に標準溶液を希釈し、内標準添加 測定 ピーク検出 5 ~ 10 倍に標準溶液を希釈し、内標準添加 測定 の順に操作を繰り返す。ピークが観察できなくなるか (S/N比 < 5) または、対象物質を添加していない溶液 (検量線ブランク溶液) とピーク強度 (ピーク比) が等しくなった時点で操作を終了する。ピーク比を縦軸、注入量又は濃度を横軸にプロットして、検量線を作成する。

Step-3 繰り返し試験用標準溶液の作成

Step-2 で測定したクロマトグラムを参考にして、S/N比 5 ~ 15 (IDL の5倍以下) 程度の濃度の標準溶液を作成する。

< 注 > S/N比 5 以下ではベースライン補正にノイズの影響を強く受け、S/N比 15 以上では相対標準偏差が小さくなりすぎるため、濃度とS/N比との関係はこの範囲内に収める。

Step-4 標準偏差 (Sd) の算出 (母集団標準偏差ではなく標本標準偏差であり、Sd は偏差平方和を (n - 1) で除した値の平方根)

Step-3 で作成した繰り返し試験用標準溶液を測定し、検量線から注入量又は濃度を求める。これを5回以上繰り返して標準偏差 (Sd-s) を計算する。検量線ブランク溶液に対象物質のピークが観察されない場合は、前述のSd-sを繰り返し試験の標準偏差 (Sd) とする。

検量線ブランク溶液に明瞭な対象物質のピークが観察された場合には、検量線ブランク溶液を5回以上繰り返し測定し、その標準偏差 (Sd-b) を計算する。この場合には、Sd-s と Sd-b を比べ大きい方を Sd とする。

Step-5 装置検出限界 (IDL) の算定

n回繰り返し試験を行った時のIDL (pg または pg / µL) は、次式により算定する。

$$IDL = t(n - 1, \quad) \times Sd$$

ここで、 : 危険率で1%または5%のいずれかを採用する。

t (n - 1,): 危険率 1% (=0.01) または危険率 5% (=0.05) 自由度 n - 1 における t 値 (片側)
 Sd : Step-4 で計算した繰り返し試験の標準偏差

t 分布表

繰り返し回数(n)	自由度(n - 1)	危険率 5% (片側)	危険率 1% (片側)
5	4	2 . 1 3 2	3 . 7 4 7
6	5	2 . 0 1 5	3 . 3 6 5
7	6	1 . 9 4 3	3 . 1 4 3
8	7	1 . 8 9 5	2 . 9 9 8
9	8	1 . 8 6 0	2 . 8 9 6
10	9	1 . 8 3 3	2 . 8 2 1
11	10	1 . 8 1 2	2 . 7 6 4
12	11	1 . 7 9 6	2 . 7 1 8

Step-6 試料濃度への換算

試料量、最終液量、装置注入容量等を勘案し、IDL を試料濃度に換算した値 (試料濃度換算値) を求める。IDL を pg の単位で算出したときの計算式を以下に示す。

試料濃度換算値(ng / L)

$$= \{ (IDL (pg) \div 試料注入容量(\mu L)) \times 最終液量(mL) \} \div 試料量(L)$$

Step-7 記録及び保存

IDL の算定に係る項目としては、対象物質名、注入量、繰り返し試験の 1 回ごとの結果、繰り返し試験平均値、標準偏差、IDL 及び試料濃度換算値等を記録する。また、くり返し試験のクロマトグラム及びワークステーション内の測定生データ、解析データをファイルとして保存しておく。

2 - 2 測定値の品質管理と評価

(1) 検出下限値 (MDL)

試料の分析に先立ち、次の試験を行い分析法の検出下限値 (MDL : Method Detection Limit) を求め、各分析法の目標とするMDLが達成できることを確認しておく。達成できない場合には、試料量を増やしたり、測定用試料液をより濃縮すること等で対応するが、その場合には手順を記録しておく。

空試験において対象物質が検出されない場合

検量線の最低濃度の2～5倍 (又は、IDLの2～5倍) になるように精製水に各分析法に記載の抽出溶媒に対象物質を添加して、所定の前処理、試料液の調製、測定の実行を行い、個々の測定値を求める。これらの値を試料中濃度に換算し、標準偏差(s)から、次式によりMDLを算出する。

$$MDL = t(n - 1, \quad) \times s$$

ここで、 $t(n - 1, \quad)$ は自由度 $n - 1$ の危険率 (片側) の t 値であり、次の t 分布表の値を使用する。

繰り返し回数(n)	自由度(n - 1)	危険率5% (片側)	危険率1% (片側)
5	4	2.132	3.747
6	5	2.015	3.365
7	6	1.943	3.143
8	7	1.895	2.998
9	8	1.860	2.896
10	9	1.833	2.821
11	10	1.812	2.764
12	11	1.796	2.718

空試験において対象物質が検出される場合

各分析法に示した空試験を5回以上繰り返す。個々の測定値を試料中濃度に換算し、標準偏差(s)から、次式によりMDLを算出する。

$$MDL = t(n - 1, \quad) \times s$$

ここで、 $t(n - 1, \quad)$ は自由度 $n - 1$ の危険率 (片側) の t 値である。

算定したIDLは、表5の「検出下限値 (MDL) 及び定量下限値 (MQL) の算定記録表」に記録する。

ただし、空試験の測定値が高すぎたり、バラツキが大きければ、適切なMDLが算出できない。このため、本法によるMDLの算出は次の事項の確認が前提となるので注意が必要である。

- ・対象物質の検出原因が分析操作上の汚染と考えられる場合には、汚染の原因を究明し、操作ブランク値を可能な限り低減させておくこと。

- ・操作ブランク試験の繰り返し測定において、各測定値間のバラツキを十分に

小さくし安定させておくこと。許容できるバラツキの目安は、「操作ブランク値の平均値 \pm (目標MDLの1/2)」以内である。

(2) 定量下限値 (MQL)

MDLの3倍値をその分析法の定量下限値 (MQL : Method Quantification Limit) とする。

算定した定量下限値は、表5の「検出下限値 (MDL) 及び定量下限値 (MQL) の算定記録表」に記録する。

(3) 装置の感度変動の日常チェック

1日に1回以上、または、10試料に1回以上、定期的に検量線の間程度標準液を測定し、装置感度が検量線作成時に比べて $\pm 20\%$ 以内であることを確認する。これを超えて変動する場合にはその原因を究明し取り除いた後、それ以前の試料について再測定する。

(4) 操作ブランク試験

操作ブランク試験は、試験液の調製または分析機器への導入操作等に起因する汚染を確認し、試料の分析に支障がない測定環境に設定するために行うものである。

操作ブランク値が大きいと測定感度が悪くなるばかりでなく、定量下限値が大きくなり測定値の信頼性が低下する。したがって、操作ブランク値は極力低減を図り、試料濃度への換算値が目標定量限界値以下になるよう管理する。試験頻度は、10試料ごとに1回、または1日に1回 (測定試料が10試料以下) 行う。

(5) 添加回収試験

添加回収試験では、試料液中の濃度が定量下限値の10倍量程度となるように測定対象の標準物質を試料マトリックスに添加して、所定の前処理、試料液の調製、測定の実行を行い、回収率が80~120%の範囲にあることを確認する。同位体希釈法を用いた方法では、サロゲート標準物質の回収率は50~120%の範囲にあることを確認する。ただし、操作ブランク値が大きかったり、試料中に対象物質が含まれる場合は、その濃度が回収率に影響しない程度に標準物質の濃度を増やして試験を行う。

回収率が許容できる範囲を大きく逸脱する場合は、その原因を究明した後、試料の再採取または粗抽出液から測定をやり直す。

回収率の測定は実試料の測定に先立ち行う。また、一連の試料の測定にあって、前処理や試料液の調製に用いる試薬の製造メーカーあるいはロットが異なるなど、回収率が変化する可能性があるときには、回収率の再確認を行う必要がある。

(6) 二重測定

試料採取、前処理操作及び機器分析における総合的な信頼性を確保するために、同一条件で採取した2つ以上 (原則として3つ) の試料について同様に分析する。頻度は10試料ごとに1回を目安とする。

定量下限値以上の濃度の試料で2つ以上 (3つ) の測定値の差が平均値に比べて30%以下であることを確認する。測定値の差が大きい場合は、その原因を究明して取り除き、再測定を行う。

(7) トラベルブランク値の測定

トラベルブランク試験は、試料採取準備時から試料測定時までの汚染の有無を確認するためのものであり、採取操作以外は試料と全く同様に扱い、持ち運んだものを測定し、トラベルブランク値とする。

移送中に汚染が考えられる場合には、一連の試料採取において試料数の10%程度の頻度で、少なくとも3試料以上行う。

ただし、トラベルブランク値を管理しておけば、毎回行う必要はないが、試料採取における信頼性を確保するため、前もってトラベルブランク値について十分検討しておき、必要に応じそのデータが提示できるようにしておく。

(8) 異常値、欠測値の取り扱い

分析機器の感度の変動が大きい場合、二重測定の結果が大きく異なる場合、トラベルブランク値が大きく試料の汚染の可能性がある場合などには、測定値の信頼性に問題があるため、再測定を行ったり、そのデータは欠測扱いとして再測定を行う。

このような問題は、多大な労力、時間、コストがかかるだけでなく、異常値や欠測値が多くなると、調査結果全体の評価に影響するため、事前のチェックを十分に行い、異常値や欠測値を出さないように注意する。また、異常値や欠測値が出現した経緯を十分に検討し、記録に残しておき、以後の再発防止に役立てることが重要である。

(9) 測定操作の記録

以下の情報を記録し、整理・保管しておく。

- ・試料採取に使用する装置や器具の調整、校正及び操作
- ・容器等の取り扱い及び保管の状況
- ・採取対象の条件及び状況（採取方法、採取地点、採取日時）
- ・試料に関する調査項目（水質：pH、有機物濃度、懸濁物質量など）
- ・試料調製条件
- ・分析装置の校正及び操作
- ・測定値を得るまでの各種の数値

表3 標準物質（標準溶液）記録表

分析対象物質名			
標準物質名			
メーカー名			
規格			
容量			
LOT番号			
含有量			
濃度			
購入年月日	年 月 日		
有効年月日			
開封年月日			
保管場所			
使用履歴	使用年月日	使用量	使用者名
	年 月 日		
	年 月 日		
	年 月 日		
	年 月 日		
	年 月 日		
	年 月 日		
	年 月 日		
	年 月 日		
	年 月 日		
	年 月 日		
	年 月 日		
	年 月 日		
	年 月 日		
備考			

表4 装置検出下限値 (IDL) の算定記録表

分析対象物質名			
抽出試料量 (ml)			
最終液量 (ml)			
注入液濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
GC/MS注入液量 (μl)			
GC/MS注入量 (ng)			
検量線ブランクの有無		有り ・ 無し	
無しの場合		有りの場合、ブランク値	
測定結果	1		1
	2		2
	3		3
	4		4
	5		5
	6		6
	7		7
	8		8
	9		9
	10		10
	11		11
	12		12
標準偏差 (Sd - s)		標準偏差 (Sd - b)	
採用した標準偏差 (Sd)			
繰り返し回数 (n)			
自由度 (n - 1)			
IDL (ng)			
IDL 試料濃度換算値 ($\mu\text{g}/\text{l}$)			

表5 検出下限値 (MDL) 及び定量下限値 (MQL) の算定記録表

分析対象物質名			
抽出試料量 (ml)			
最終液量 (ml)			
注入液濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
GC/MS注入液量 (μl)			
GC/MS注入量 (ng)			
空試験での対象物質の有無		有り・無し	
無しの場合 (試料中濃度換算値)		有りの場合、空試験値 (試料中濃度換算値)	
測定結果	1		1
	2		2
	3		3
	4		4
	5		5
	6		6
	7		7
	8		8
	9		9
	10		10
	11		11
	12		12
標準偏差 (S)		標準偏差 (S)	
繰り返し回数 (n)		繰り返し回数 (n)	
自由度 (n - 1)		自由度 (n - 1)	
MDL ($\mu\text{g}/\text{l}$)		MDL ($\mu\text{g}/\text{l}$)	
MQL ($\mu\text{g}/\text{l}$) = MDL \times 3		MQL ($\mu\text{g}/\text{l}$) = MDL \times 3	

3. 水試料中フェニトロチオンの測定に関する標準作業手順書 (SOP)

3-1 分析法の概要、試薬類、器具および装置

(1) 分析法の概要

試料中のフェニトロチオンは、ジクロロメタンによる溶媒抽出し、脱水・濃縮、内標準物質を添加した後、GC/MS (SIM) で定量する。検出限界値は 0.01 ~ 0.05 µg/L 程度を目標とする。

(2) 試薬類

- ・標準品：フェニトロチオン標準品 (残留農薬試験用 和光純薬工業)
- ・内標準物質：フルオランテン - d₁₀ 標準品 (環境分析用 和光純薬工業)
- ・ジクロロメタン、ヘキサン、アセトン、無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用 (和光純薬工業)
- ・塩化ナトリウム 残留農薬試験用 (和光純薬工業) を 600 で 4 時間加熱
- ・無水硫酸ナトリウム 残留農薬試験用 (和光純薬工業)
- ・窒素ガス：高純度窒素 1 級 (純度 99.999% 以上)
- ・精製水：測定妨害となる物質を含有しない超純水

(3) 器具および装置

- ・分液ロート、共栓付試験管、メスフラスコなどのガラス器具
- ・振とう機
- ・ロータリーエバポレータ
- ・ガラス繊維ろ紙：孔径 1 µm であって測定妨害となる物質を含まないもの
- ・超音波抽出器：超音波洗浄器または同等品
- ・ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS)

3-2 水質試料の抽出法

懸濁物質の多い試料水 (目安として SS 濃度 50 µg/mL 以上) は予めガラス繊維ろ紙によるろ過を行い、懸濁物質とろ液を個別に抽出する。懸濁物質中のフェニトロチオンは、アセトンによる超音波抽出を行い、抽出液はろ液試料に移す。抽出と洗浄に用いるアセトンの量は、ろ液量の 5% 程度にとどめる。

懸濁物質の少ない試料水またはろ液は、その 500 mL を分液ロートにとり、塩化ナトリウム 25 g およびジクロロメタン 50 mL を加え、振とう機で 10 分間抽出し、静置してジクロロメタン層を分取する。同様の抽出操作を繰り返し、ジクロロメタン抽出液は 300 mL 容の分液ロートに合わせ、ヘキサン 100 mL を加えて、無水硫酸ナトリウムで脱水する。ジクロロメタンとヘキサンの混合抽出液は、ロータリーエバポレータを用いて 2 mL まで濃縮する。

3-3 測定用試料溶液の調整

水質試料の濃縮した抽出液に、窒素ガスを穏やかに吹き付けて溶媒を留去し、直ちに測定用内標準溶液を 1.0 mL 添加し、GC/MS の試験液とする。

3 - 4 空試験液の調製

試料と同量の精製水をもちいて、3 - 2 および 3 - 3 の操作を行い、空試料液を調製する。

3 - 5 標準液の調製

標準物質 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アセトン溶液を標準原液とする。標準原液をアセトンで希釈し 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準溶液を調製する。測定用内標準溶液は、フルオランテン - d₁₀ をアセトンに溶解して 5 ng/mL に調製する。

3 - 6 GC / MS 測定

(1) 測定条件

ガスクロマトグラフ (GC)

- ・カラム：HP - 5 MS (0.25mm \times 30m、0.25 μm)
- ・液相：5%フェニルメチルシリコン
- ・カラム温度：50 (1分) - 20 /分 - 200 - 5 /分 - 280 (5分)
- ・注入口温度：250
- ・注入法：スプリットレス (パージオフ時間1分)
- ・キャリアガス：ヘリウム (流量 2mL/min、線速度 42 ~ 51 cm/sec)

質量分析計 (MS)

- ・インターフェイス温度：280
- ・イオン化エネルギー：70eV
- ・イオン源温度：250
- ・イオン化電流：300 μA
- ・イオン化法：電子衝撃イオン化 (EI) 法
- ・質量校正：MSに質量校正用標準物質のPFKを導入して、MSの質量校正プログラムによりフラグメントパターンおよび分解能 (500以上) 等の校正を行うと共に、装置の感度等の基本的なチェックを行い、これらの結果は測定結果と共に記録に残す。

・モニターイオン：

フェニトロチオン ; (定量用) 277.02
(確認用) 260.01、124.98
フルオランテン - d₁₀ ; 212.14

(2) 検量線

検量線作成用の試験液 2 μL を GC / MS に注入し、得られたクロマトグラムの標準物質と内標準物質のピーク面積比および濃度比から検量線を作成する。

(3) 定量

試料液 2 μL を GC / MS に注入し、得られたクロマトグラムの被検物質と内標準物質のピーク面積比により、検量線から定量する。

(4) 計算

$$C(\mu/L) = S_{\text{abs}}(\text{ng}) \times V_{\text{conc}}(\text{mL}) \times 1,000 / (V_{\text{inj}}(\mu\text{L}) \times V_{\text{spl}}(\text{mL}))$$

- ここで、C : 試料水中のフェニトロチオン濃度(μ/L)
S_{abs} : 検量線から求めた試料液中フェニトロチオン量(ng)
V_{conc} : 試料液の最終液量(mL)
V_{inj} : GC/MSへの注入量(μL)
V_{spl} : 試料水量(mL)

4. 品質管理報告書

分析は各対象物質ごとに定めた標準作業手順書(SOP)に基づいて適正に行い、かつ、分析精度管理に関する以下の情報を記録し、分析データとともに報告する。

現地調査及び試料採取に関すること

標準物質及び内部標準物質に関すること

装置検出下限値(IDL)、検出下限値(MDL)及び定量下限値(MQL)に関すること

GC/MSのチューニングに関すること

精度管理全般に関すること

- ・分析結果
- ・標準物質
- ・分析機器(GC/MS)の設定
- ・分析機器(GC/MS)の日常的点検
- ・検量線の作成等
- ・検出下限値等
- ・操作ブランク試験等

なお、分析データは、生データのチャート打ち出しだけでなく、ワークステーション内のデータファイル、データ処理ファイル(検量線、定量計算)等もファイル名をリストとして整理して保存しておく。

分析精度管理總括表

(1) 分析結果

物質名			
分析法			
分析担当者	分析開始日	年	月 日
	分析終了日	年	月 日

試料番号	試料名	採取年月日
		年 月 日
		年 月 日
		年 月 日
		年 月 日
		年 月 日
		年 月 日
		年 月 日
		年 月 日
		年 月 日
		年 月 日

試料番号	分析結果 ($\mu\text{g/L}$)	標準偏差 ($\mu\text{g/L}$)	定量限界 ($\mu\text{g/L}$)	測定回数 (回)

(2) 標準物質及び内部標準物質

標準物質名	規格	容量	メーカー名	LOT番号

内部標準物質名	規格	容量	メーカー名	LOT番号

(3) 分析機器 (G C / M S) の設定

使用機器	名 称
G C 部	
M S 部	

使用機器	分析条件																								
G C 部	カラム カラム温度 注入口温度 注入法 ヘッド圧																								
M S 部	インターフェース温度 イオン源温度 イオン化電圧 イオン化電流 イオン化法 検出モード モニターイオン <table border="1" data-bbox="448 1482 1366 1848"> <thead> <tr> <th>物質名</th> <th>定量イオン</th> <th>参照イオン</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </tbody> </table>	物質名	定量イオン	参照イオン																					
物質名	定量イオン	参照イオン																							

(4) 分析機器 (G C / M S) の日常的点検

管理項目	設定値	応答値	判定	判定基準	備考
オープン温度				設定値に対して正常に作動するか	
注入口温度				設定値に対して正常に作動するか	
イオン源温度				設定値に対して正常に作動するか	
インターフェース温度				設定値に対して正常に作動するか	
ヘッド圧				設定値に対して正常に作動するか	
MSチューニング				質量校正プログラムにより調整されているか	チューニングレポートに記録
保持時間 物質名 ()				標準物質の保持時間が5%の範囲内にあること	
保持時間 物質名 ()				同上	
保持時間 物質名 ()				同上	
保持時間 物質名 ()				同上	
保持時間 物質名 ()				同上	

(5) 検量線の作成等

対象物質名					
定量方法： 内部標準法	内部標準物質				
	種類		添加量		
	サロゲート物質				
	種類		添加量		
標準原液	1. 購入 濃度 () 溶媒の種類 () メーカー名 ()				
	2. 自作 濃度 () 溶媒の種類 ()				
検量線 (代表例)	作成点数 ()				
	検量線範囲 (GC / MS 注入量) 及び測定値				
	範囲 (単位：)	標準物質 面積	内部標準 面積	サロゲート 面積	面積比
	検量線の回帰式				

(6) 検出下限値等

		装置検出下限値 (装置検出限界値) (IDL)	検出下限値 (検出限界値) (MDL)	定量下限値 (定量限界値) (MQL)
		単位()	単位()	単位()
測定回数	1			
	2			
	3			
	4			
	5			
	6			
	7			
	8			
	9			
	10			
	11			
	12			
平均値				
標準偏差 Sd				
n				
自由度(n-1)				
t(n-1,)				
Sd × t(n-1)				
IDL				
MDL				
MQL				
SOPによる目標値				

(7) 操作ブランク試験等

操作ブランク試験結果 (対象物質名:)							
媒体	試料量	測定値					
		1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	平均値
水質							
					検出限界値		

添加回収試験結果 (対象物質名:)							
添加濃度 (水質: $\mu\text{g/L}$)							
媒体	測定値						
	無添加	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目
水質							
	7回目	8回目	9回目	平均値	回収率(%)	変動係数(%)	
				検出限界値			

トラベルブランク試験結果 (対象物質名:)							
媒体	試料量	測定値					
		1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	平均値
水質							
					検出限界値		