

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》環境汚染診断薬エコロジーナ アルキルフェノール（AP）ELISAキット （マイクロプレート）

平成17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)

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	環境汚染診断薬エコロジーナ アルキルフェノール (AP) 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	アルキルフェノール (A P)
実証試験の実施期間	平成 16 年 12 月 14 日 ~ 平成 17 年 1 月 22 日

1. 実証対象技術の概要

この実証対象製品は、アルキルフェノール (AP) に対する特異的なモノクローナル抗体を応用した、環境中 (対象環境媒体: 水質、底質) の AP 測定 ELISA キットである。

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

2. 実証試験の概要

実証試験項目の内容は、次のとおりである。

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

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

3. 実証対象製品のデータ

環境技術開発者より提出された実証対象製品のデータは、次のとおりである。

項目	記入欄
製品名	環境汚染診断薬エコロジーナ アルキルフェノール(AP) ELISA キット(マイクロプレート)
型番	300-15101《和光純薬工業(株)商品コード》
販売・製造元	《販売》和光純薬工業(株)《製造》日本エンバイロケミカルズ(株)
重量(キット一式、g)	580g
価格(円)	
分析対象物質	アルキルフェノール(ノニルフェノール、オクチルフェノール)
対象環境媒体	水質・底質・生物・その他() 底質試料は抽出操作が必要。
利用用途	環境試料中のアルキルフェノール濃度の測定
標準試薬・種類	付属(調製済/調製要) 使用時にノニルフェノール標準液(0, 50, 200, 1000, 5000µg/L: 10%DMSO+20%メタノール溶液)を各々10倍希釈する。
操作環境(室温)	15 ~ 30 (恒温槽(例20)の使用が望ましい)
製品保管条件	2~8
製品保証期間	製造後12ヶ月間(新製品につき使用期限延長の可能性あり)
同時測定数(最多)	43試料(n=2で1キット使用時)
測定時間	2.5時間(固相抽出等の前処理時間を除く)

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

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	アルキルフェノール (AP) 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	アルキルフェノール (AP)	
実証試験計画書の策定	平成 16 年 12 月	
実証試験の実施期間	平成 16 年 12 月 14 日 ~ 平成 17 年 1 月 22 日	
1) 基本的な性能	実験データ	【参考：製品データ】
測定範囲	調製濃度 5 ~ 500µg/L での相対値： 100.4 ~ 117.8%、CV：4.7 ~ 40.1%	5 ~ 500µg/L
検出下限及び定量下限	調製濃度 5µg/L の SD から求めた検出下限 (3SD)：2.6µg/L、 定量下限 (10SD)：8.6µg/L	定量下限：5µg/L
繰返し再現性	調製濃度 20µg/L での CV：9.2%、 SD：1.9µg/L	測定範囲 5 ~ 500µg/L での CV：2.0 ~ 11.0%
日間再現性	調製濃度 5 ~ 500µg/L での CV (連続 3 日)： 1.0 ~ 7.4%	-
期間再現性	調製濃度 5 ~ 500µg/L で、1 ヶ月を隔てて 2 回測定した値の CV：0 ヶ月 3.6 ~ 15.2% 1 ヶ月後 1.0 ~ 10.9%	-
プレート間再現性	調製濃度 5 ~ 500µg/L での CV (同一プレート 2 枚、異プレート 1 枚間)： 4.9 ~ 11.6%	-
交差反応性	交差反応率： 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム < 0.1% 4-t-オクチルフェノール 109%	交差反応率： 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム < 0.1% 4-t-オクチルフェノール 115%
2) 実用的な性能		
回収特性	ニルフェノールを添加 (20µg/L) した河川水に、 フミン酸ナトリウムを添加 (0, 1, 5, 10, 50mg/L) した 試料の回収率：各々 84.0, 85.0, 92.6, 195, 1050%	-
測定精度等	河川水を直接測定：ELISA 法では不検出。 機器分析では 4-ニルフェノールが検出、オ クチルフェノール類は不検出。 固相抽出による濃縮処理後は ELISA 法で検 出可能。	機器分析との相関： ELISA=0.80 × GC-MS/MS + 6.6 (R ² =0.95)
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、20 ~ 500µg/L の濃度範囲においては、ほぼ妥当な製品性能の信頼性を確認した。</p> <p>2) 一般環境モニタリングでの実用性：実試料として河川水を用いた実証試験では、一般の河川でのアルキルフェノール類濃度が本キットの感度に比較し低濃度であることから、適切な前処理を行えば実用化が可能である。</p> <p>3) 製品操作等の簡便性：一般環境モニタリングでの使用を想定した場合、試料の前処理がない場合、約 3 時間で測定結果が得られ、前処理を伴う場合約 3 日 (機器分析と同程度の日数) で測定結果が得られる。 なお、カートリッジカラムによる前処理がない場合、同時に約 25 試料 (3 重測定) の測定が可能である。 また、本試験での GC/MS - SIM 法では、3 試料 (3 重測定) の測定に約 3 日が必要である。</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	8
(3) 繰り返し再現性	9
(4) 日間再現性	10
(5) 期間再現性	11
(6) プレート間再現性	12
(7) 交差反応性	13
4.3 実用的な性能	15
(1) 回収特性	15
(2) 測定精度等	16

5. 試験結果	19
5.1 基本的な性能	19
(1)測定範囲	19
(2)検出下限及び定量下限	20
(3)繰返し再現性	22
(4)日間再現性	23
(5)期間再現性	27
(6)プレート間再現性	29
(7)交差反応性	33
5.2 実用的な性能	37
(1)回収特性	37
(2)測定精度等	39
6. 実証試験結果の検討と考察	42

付録： 実証試験計画書

1. 実証試験の概要

1.1 実証対象製品のデータ

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

表 1.1.1 実証対象製品のデータ

項目	内 容
技術・製品の名称	環境汚染診断薬エコロジーナ アルキルフェノール (AP) ELISA キット (マイクロプレート)
実証申請者	日本エンバイロケミカルズ株式会社 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 葵庁舎 (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 16 年 12 月 14 日 ~ 平成 17 年 1 月 22 日
製品名	環境汚染診断薬エコロジーナ アルキルフェノール (AP) ELISA キット (マイクロプレート)
型番	300-15101 《和光純薬工業 (株) 商品コード》
販売・製造元	《販売》和光純薬工業 (株) 《製造》日本エンバイロケミカルズ (株)
重量 (g)	580 g
価格 (円)	
分析対象物質	アルキルフェノール (ノニルフェノール、オクチルフェノール)
対象環境媒体	水質・底質 ・生物・その他 () 底質試料は抽出操作が必要。
利用用途	環境試料中のアルキルフェノール濃度の測定
標準試薬・種類	付属 (調製済 / 調製要) 使用時にノニルフェノール標準液 (0, 50, 200, 1000, 5000µg/L : 10%DMSO + 20%メタノール溶液) を各々 10 倍希釈する。
操作環境 (室温)	15 ~ 30 (恒温槽 (例 20) の使用が望ましい)
製品保管条件	2 ~ 8
製品保証期間	製造後 12 ヶ月間 (新製品につき使用期限延長の可能性あり)
同時測定数 (最多)	43 試料 (n=2 で 1 キット使用時)
全体測定時間	2.5 時間 (固相抽出等の前処理時間を除く)

< 参 考 >

アルキルフェノール類 : 環境省 SPEED ' 98 の「内分泌かく乱作用を有すると疑われる物質」

ノニルフェノール : P R T R 法の第 1 種指定化学物質 (政令番号 242)

用途 : 非イオン系界面活性剤の原料。工業用洗剤、分解剤として、ゴム・プラスチック・繊維工業、機械・金属工業、農薬工業などで使用。

オクチルフェノール : P R T R 法の第 1 種指定化学物質 (政令番号 59)

用途 : 油性フェノール樹脂、非イオン系界面活性剤の原料。

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（5, 20, 100, 500 $\mu\text{g/L}$ ）を測定した実測値の相対値は、100.4～117.8%、変動係数は、4.69%～40.12%であった。

（製品の定量範囲は、5～500 $\mu\text{g/L}$ ）

検出下限及び定量下限

製品の測定下限付近（5 $\mu\text{g/L}$ ）に調製した試験用試料溶液を繰返し（ $n=8$ ）測定した実測値（濃度）の標準偏差（SD）から求めた検出下限（3SD）は、2.586 $\mu\text{g/L}$ 、定量下限（10SD）は、8.620 $\mu\text{g/L}$ であった。

（製品の定量下限は、5 $\mu\text{g/L}$ （ $B/B_0\%=80\pm 10\%$ ））

繰返し再現性

製品の測定範囲の直線域（20 $\mu\text{g/L}$ ）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、9.20%（標準偏差 1.861 $\mu\text{g/L}$ ）であった。

（製品の定量範囲（5～500 $\mu\text{g/L}$ ）でのデータ：変動係数 2.0～11.0%、 $n=10$ ）

日間再現性

製品の測定範囲（5～500 $\mu\text{g/L}$ ）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、5.37%（5 $\mu\text{g/L}$ ）、1.03%（20 $\mu\text{g/L}$ ）、6.06%（100 $\mu\text{g/L}$ ）、7.42%（500 $\mu\text{g/L}$ ）であった。

（製品のデータは示されていない）

期間再現性

製品の測定範囲（5～500 $\mu\text{g/L}$ ）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、中～高濃度（20～500 $\mu\text{g/L}$ ）ではいずれも10%未満、低濃度（5 $\mu\text{g/L}$ ）では15.17%（0ヵ月）と10.89%（1ヶ月後）であった。

（製品のデータは示されていない）

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,C）と、異なるロット（B:製造年月日はA,Cより5ヶ月前）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、8.56%（5 $\mu\text{g/L}$ ）、4.92%（20 $\mu\text{g/L}$ ）、9.30%（100 $\mu\text{g/L}$ ）、11.61%（500 $\mu\text{g/L}$ ）であった。

(製品のデータは示されていない)

交差反応性

交差反応率は、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム 0.07%、4-t-オクチルフェノール 108.5%であった。

(製品の交差反応率のデータは、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム < 0.1%、4-t-オクチルフェノール 115%)

(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ノニルフェノール (20 μ g/L) を添加し、さらにフミン酸ナトリウムを添加 (1~50mg/L) して測定したところ、フミン酸ナトリウム 10mg/L では回収率 195%、50mg/L では 1050%と、高濃度のフミン酸ナトリウムの添加により明らかに正の誤差が認められた。

測定精度等

環境試料として河川水を対象とし、ELISA 法は無濃縮で、機器分析は液々抽出 - GC/MS 法により分析を行った。この結果、ELISA 法ではすべての試料について、アルキルフェノール類が不検出となったため、実証試験申請者提供資料に基づき、カートリッジカラムによる固相抽出法を行い、ELISA 法と機器分析の比較を行った。その結果、データに若干のばらつきがあるものの当キットは環境水のアルキルフェノール類の測定に有効であることがわかった。

2. 実証対象技術及び実証対象製品の特性と説明

2.1 実証申請者

企業名：日本エンバイロケミカルズ株式会社
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
FAX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、アルキルフェノール（AP）に特異的なモノクローナル抗体を応用した、環境中（対象環境媒体：水質、底質）のAP測定ELISAキットである。

2.3 実証対象製品のデータ（性能、製品製造者、製品番号等）

実証対象製品のデータは、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	環境汚染診断薬エコロジーナ アルキルフェノール（AP）ELISA キット（マイクロプレート）
型番	300-15101 《和光純薬工業（株）商品コード》
販売・製造元	《販売》和光純薬工業（株）《製造》日本エンバイロケミカルズ（株）
重量（g）	580g
価格（円）	
分析対象物質	アルキルフェノール（ノニルフェノール、オクチルフェノール）
対象環境媒体	水質・底質・生物・その他（ ） 底質試料は抽出操作が必要。
利用用途	環境試料中のアルキルフェノール濃度の測定
標準試薬・種類	付属（調製済／調製要） 使用時にノニルフェノール標準液（0, 50, 200, 1000, 5000µg/L：10%DMSO + 20%メタノール溶液）を各々10倍希釈する。
操作環境（室温）	15 ~ 30 （恒温槽（例 20 ）の使用が望ましい）
製品保管条件	2 ~ 8
製品保証期間	製造後 12 ヶ月間（新製品につき使用期限延長の可能性あり）
同時測定数（最多）	43 試料（n=2 で 1 キット使用時）
測定時間	2.5 時間（固相抽出等の前処理時間を除く）

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 松原 清
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 上田 洋一
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
e-mail アドレス：ueda.youichi@pref.yamaguchi.lg.jp

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535
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16年12月14日～平成17年1月22日

4. 試験方法

4.1 共通して行う試験操作

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

(1) 製品の操作

製品の操作にあたっては、製品の取扱説明書を遵守するとともに、「品質管理マニュアル E L I S A法(アイルキルフェノール)」の試験操作手順(一般的な事項)に従って行った。

(2) 検量線作成用標準溶液の調製

製品の取扱説明書に記載の方法により、検量線用標準溶液の指定濃度系列を調製した。

(3) 吸光度の測定

吸光度は、マイクロプレートリーダー(バイオ・ラッド社製マイクロプレートリーダー)で測定し、検量線作成用標準溶液及び各試験用試料溶液の吸光度とした。

(4) 検量線の作成

プレート毎に同時に測定したゼロブランク(B L K:添付の希釈液等)及び検量線作成用標準溶液の吸光度(3重測定の平均値)から取扱説明書に従って検量線(取扱説明書の指示:4パラメーターによりロジスティック曲線を近似した標準曲線)を作成した。

なお、解析に使用したバイオラッド社製Microplate Manager/PC(Windows版v.5.2.1)は、仕様上回帰式の R^2 が計算されないため記載しない。

(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	アルキルフェノール
対象製品名	環境汚染診断薬エコロジーナ アルキルフェノール(AP)ELISAキット (マイクロプレート)
製品番号	ロット番号:T2FQ2
製造年月日	平成16年6月18日
測定範囲(製品仕様)	5~500 μ g/L
試験日時	平成16年12月16日 11:00 ~ 14:20
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	21.6 ~ 20.1
使用した市販標準品	物質名:4-ノニルフェノール 試薬会社名:関東化学 製品番号:28640-96 ロット番号:410F2007
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5/PC(パイオ・ラッド社製)
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

4-ノニルフェノールを用い、1%DMSO+10%メタノール溶液を希釈溶媒として、試験用試料溶液(0, 5, 20, 100, 500 μ g/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

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	アルキルフェノール
対象製品名	環境汚染診断薬エコロジーナ アルキルフェノール(AP) ELISA キット (マイクロプレート)
製品番号	ロット番号：T2FQ2
製造年月日	平成 16 年 6 月 18 日
測定範囲(製品仕様)	5 ~ 500 μ g/L
試験日時	平成 16 年 12 月 20 日 11:10 ~ 13:40
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	19 ~ 20.0
使用した市販標準品	物質名：4-ノニルフェノール 試薬会社名：関東化学 製品番号：28640-96 ロット番号：410F2007
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5/PC(パイオ・ラッド社製)
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

4-ノニルフェノールを用い、1%DMSO + 10%メタノール溶液を希釈溶媒として、試験用試料溶液(5 μ g/L:測定範囲の下限付近濃度)を調製した。調製した試験用試料溶液を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) 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	アルキルフェノール
対象製品名	環境汚染診断薬エコロジーナ アルキルフェノール(AP) ELISA キット (マイクロプレート)
製品番号	ロット番号：T2FQ2
製造年月日	平成 16 年 6 月 18 日
測定範囲(製品仕様)	5 ~ 500 μ g/L
試験日時	平成 16 年 12 月 20 日 13 : 40 ~ 16 : 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	20.0 ~ 19.9
使用した市販標準品	物質名：4-ノニルフェノール 試薬会社名：関東化学 製品番号：28640-96 ロット番号：410F2007
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5/PC(パイオ・ラッド社製)
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

4-ノニルフェノールを用い、1%DMSO + 10%メタノール溶液を希釈溶媒として、試験用試料溶液(20 μ g/L：測定範囲の直線付近濃度)を調製した。調製した試験用試料溶液を3重測定で8回測定し、得られた8個の実測濃度より平均値、標準偏差、変動係数を求めた。求めた変動係数から、繰返し再現性について検討した。

(4) 日間再現性

試験条件

本製品の日間再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.4 日間再現性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・日間再現性(標準試料試験)
対象物質	アルキルフェノール
対象製品名	環境汚染診断薬エコロジーナ アルキルフェノール(AP) ELISA キット (マイクロプレート)
製品番号	ロット番号：T2FQ2
製造年月日	平成 16 年 6 月 18 日
測定範囲(製品仕様)	5 ~ 500µg/L
試験日時	平成 16 年 12 月 16 日 11 : 00 ~ 14 : 20 平成 16 年 12 月 17 日 11 : 30 ~ 14 : 15 平成 16 年 12 月 18 日 9 : 10 ~ 12 : 00
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	21.6 ~ 20.1 18.0 ~ 19.8 19.1 ~ 19.3
使用した市販標準品	物質名：4-ノニルフェノール 試薬会社名：関東化学 製品番号：28640-96 ロット番号：410F2007
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5/PC(バイオ・ラッド社製)
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。

(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	アルキルフェノール
対象製品名	環境汚染診断薬エコロジーナ アルキルフェノール(AP) ELISA キット (マイクロプレート)
製品番号	ロット番号: T2FQ2
製造年月日	平成 16 年 6 月 18 日 (T2FQ2)
測定範囲 (製品仕様)	5 ~ 500 μ g/L
試験日時	平成 16 年 12 月 18 日 9:10 ~ 12:00 平成 17 年 1 月 22 日 9:20 ~ 11:50
試験時室内温度	19.1 ~ 19.3 18.0 ~ 19.1
試験場所	山口県環境保健研究センター 薬庁舎
使用した市販標準品	物質名: 4-ノニルフェノール 試薬会社名: 関東化学 製品番号: 28640-96 ロット番号: 410F2007
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5/PC (バイオ・ラッド社製)
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

同一ロットのプレートを用い、1ヶ月の期間を隔てて2回、同じ測定操作(「(1)測定範囲」に同じ)を行った。各測定結果(OD値)からの換算値(濃度)の変動係数を求め、期間を隔てての再現性について検討した。

(6) プレート間再現性

試験条件

本製品のプレート間再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.6 プレート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	アルキルフェノール
対象製品名	環境汚染診断薬エコロジーナ アルキルフェノール(AP)ELISAキット (マイクロプレート)
製品番号	ロット番号：T2FQ2、T2AQ3
製造年月日	平成 16 年 6 月 18 日 (T2FQ2)、平成 16 年 1 月 16 日 (T2AQ3)
測定範囲(製品仕様)	5 ~ 500 μ g/L
試験日時	平成 16 年 12 月 18 日 9 : 10 ~ 16 : 50
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	19.1 ~ 19.6
使用した市販標準品	物質名：4-ノニルフェノール 試薬会社名：関東化学 製品番号：28640-96 ロット番号：410F2007
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5/PC(パイオ・ラッド社製)
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。

(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	アルキルフェノール
対象製品名	環境汚染診断薬エコロジーナ アルキルフェノール(AP) ELISA キット (マイクロプレート)
製品番号	ロット番号：T2FQ2
製造年月日	平成 16 年 6 月 18 日
測定範囲(製品仕様)	5 ~ 500µg/L
試験日時	平成 16 年 12 月 22 日 11:00 ~ 16:55
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	18.0 ~ 19.4
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャ-5/PC(バイオ・ラッド社製)
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4.2.8 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	4-ノニルフェノール	関東化学	環境分析用	97.6%	28640-96	410F2007
類似物質	直鎖ドデシルベンゼン スルホン酸ナトリウム	和光純薬工 業	ABS 測定用	99.0% (minimum)	190-07431	ELP9573
	4-t-オクチルフェノ ール	和光純薬工 業	環境分析用	97.0% (minimum)	208-14451	JSE9514

表 4.2.9 試験用試料溶液

	物質名	試料溶液調製濃度
類似物質	直鎖ドデシルベンゼン スルホン酸ナトリウム	0, 0.2, 0.8, 4, 20mg/L
	4-t-オクチルフェノ ール	0, 5, 20, 100, 500µg/L

試験操作

4-ノニルフェノール及び類似物質について調製した試料溶液で吸光度曲線(実測値は3重測定の平均値から求めた)を描き、吸光度曲線から類似物質の50%発色阻害濃度を求めた。(4-ノニルフェノールの50%発色阻害濃度/類似物質の50%発色阻害濃度)×100(%)で交差率を求めた。

類似物質を調節した濃度範囲内で50%発色阻害濃度が求められなかった場合には、より低い発色阻害濃度から交差率を求めた。

4.3 実用的な性能

(1) 回収特性

試験条件

本製品の回収特性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.3.1 回収特性の試験条件

項目	内容
実証項目	実用的な性能・回収特性(模擬環境試料試験)
対象物質	アルキルフェノール
対象製品名	環境汚染診断薬エコロジーナ アルキルフェノール(AP) ELISA キット (マイクロプレート)
製品番号	ロット番号：T2FQ2
製造年月日	平成 16 年 6 月 18 日
測定範囲(製品仕様)	5 ~ 500µg/L
試験日時	平成 16 年 12 月 28 日 11:10 ~ 14:20
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	18.6 ~ 18.3
使用した市販標準品	物質名：4-ノニルフェノール 試薬会社名：関東化学 製品番号：28640-96 ロット番号：410F2007
使用した妨害物質名	物質名：フミン酸ナトリウム 試薬会社名：関東化学 製品番号：12086-1A ロット番号：A019444301
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5/PC(パイオ・ラッド社製)
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
S1	一の坂川	平成 16 年 12 月 20 日	3L x 1 本	pH 6.6 COD 1.5mgO/L

試験操作

グラスファイバーフィルター(GFC:孔径1.2µm)を用いて、河川水をろ過したろ液を原水とし、測定範囲の中央付近となるように4-ノニルフェノールを添加(20µg/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(0,1,5,10,50mg/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、妨害物質としてのフミン酸ナトリウムに対する製品の回収特性を検討した。

(2) 測定精度等

試験条件

本製品の測定精度等における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.3.3 測定精度等の試験条件

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	アルキルフェノール
対象製品名	環境汚染診断薬エコロジーナ アルキルフェノール(AP) ELISA キット (マイクロプレート)
製品番号	ロット番号:T2FQ2
製造年月日	平成 16 年 6 月 18 日
測定範囲(製品仕様)	5~500 μ g/L
試験日時	平成 16 年 12 月 21 日 13:15 ~ 15:40
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎(ELISA 法) 山口県環境保健研究センター 大歳庁舎(機器分析法)
試験時室内温度	19.7 ~ 19.8
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5/PC(バイオ・ラッド社製)
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(ELISA 法) 山口県環境保健研究センター水質部主任 田中克正(機器分析法) 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(機器分析法)

表 4.3.4 使用した環境試料

試料番号	地点名	採水日	採水量	備考
S1	一の坂川	平成 16 年 12 月 20 日	1L x 7 本	pH 6.6 COD 1.5mgO/L
S2	前田川錦川合流 後	同上	1L x 7 本	pH 6.4 COD 2.1mgO/L
S3	九田川	同上	1L x 7 本	pH 6.3 COD 2.6mgO/L

環境試料として河川水を使用し、河川水に不均一に含まれる懸濁物による影響を避けるため、採取日当日にグラスファイバーフィルター(GFC:孔径1.2 μ m)を用いてろ過したものを冷暗所保存しておき、試料として使用した。なお、固相抽出及び機器分析用の河川水は採取時にL-(+)-アスコルビン酸添加により保存処理を行った。

試験操作

-1 実試料分析

ELISA 法は試料そのままを測定対象とし、機器分析は試料を液々抽出後、GC/MS 法により測定した。

-2 固相抽出カラムの検討

日本エンバイロケミカルズ(株)提供資料の固相抽出カートリッジカラムの脱着性能を検討するため、次の方法で添加回収試験を行った。

・使用カラム : GL-PAK Glass SPE NEXUS 200mg/6ml

(ポリマー系充填剤; スチレンジビニルベンゼン・メタクリレート、LOT 番号 2119603)

・試験フロー

カラムコンディショニング	ジクロロメタン 10ml
	メタノール 5ml
	精製水(再蒸留水) 5ml

試料水負荷、固相抽出

洗浄	精製水(再蒸留水) 5ml
	水 : メタノール = 50 : 50 5ml

通気乾燥	45 分間
------	-------

溶出	ジクロロメタン 6ml
----	-------------

窒素ガス

乾固

溶媒にて再溶解後、ELISA 法又は機器分析

・試験の内容

- ア 試料水として精製水 5ml をカラムに注入後、4-ニルフェノール標準溶液(濃度 5 μ g/L メタノール溶液)を、カラムへの負荷量が 0ng、10ng、20ng、40ng、200ng、400ng となるように添加した。
- イ カラム通過後、精製水 10ml、水 : メタノール (=50:50) 5ml で洗浄し、70-のとおりに操作した。
- ウ カラムへの負荷量が 0ng、10ng、20ng、40ng のものは ELISA 法による測定を

行った。

エ カラムへの負荷量が 200ng 及び 400ng のものはジクロロメタン溶出液を 10ml にスプレッドし、それから各 1ml を分取したものを ELISA 法へ、残りの各 9ml を乾固後、内部標準を含んだメタノールにより再溶解し、機器分析を行った。

なお、ELISA 法としては 20ng 及び 40ng 相当を、機器分析としては 180ng 及び 360ng 相当を定量することとなる。

-3 実試料の固相抽出法の検討

濃縮操作をしない ELISA 法では実試料のアルキルフェノール類が不検出であったので、日本エンバイロケミカルズ㈱提供資料に基づく固相抽出法を適用して ELISA 法及び機器分析による測定を次のように行った。

・使用カラム：GL-PAK Glass SPE NEXUS 200mg/6ml

(ポリマー系充填剤; スチレンジビニルベンゼンメタクリレート、LOT 番号 2119603)

・試験フロー

カラムコンディショニング	ジクロロメタン 10ml メタノール 5ml 精製水(再蒸留水) 5ml
試料水負荷、固相抽出	試料水 1000ml
洗浄	精製水(再蒸留水) 5ml 水：メタノール=50:50 5ml
通気乾燥	45 分間
溶出	ジクロロメタン 6ml
窒素雰囲気下	
乾固	

溶媒にて再溶解後、ELISA 法又は機器分析

5. 試験結果

5.1 基本的な性能

(1) 測定範囲

検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.1 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)	
所定濃度	μg/L	0	5	20	100	500	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.097	1.009	0.675	0.338	0.145
	2	-	1.101	0.928	0.683	0.309	0.138
	3	-	1.124	0.942	0.678	0.328	0.130

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

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.11	0.995	28.1	0.0897	-

注) 解析に使用したバイオ・ラッド社製 Microplate Manager/PC(Windows 版 v.5.2.1)は、仕様上回帰式の R² が計算されないため記載しない。(以下、同様)

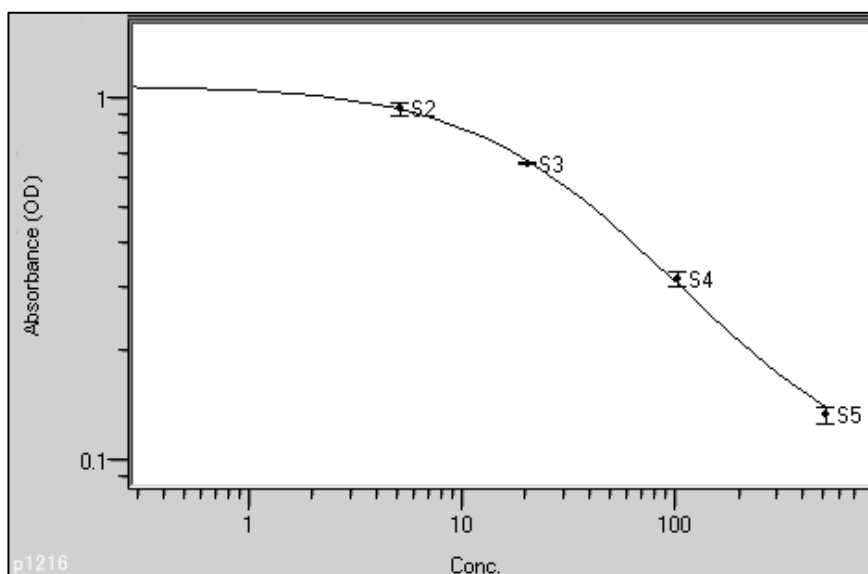


図 5.1.1 検量線

試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.3 対象物質試料溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液						
		溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4	溶液 S5		
調製濃度	μg/L	0	5	20	100	500		
実測回数	回	3	3	3	3	3		
ELISA 実測	吸光度	1	-	1.202	0.979	0.688	0.312	0.138
		2	-	1.228	0.896	0.653	0.308	0.133
		3	-	1.284	0.992	0.711	0.324	0.140
		平均	-	1.238	0.956	0.684	0.315	0.137
	換算値	μg/L	-	5.063	20.268	100.438	588.914	
標準偏差	μg/L	-	2.065	2.419	4.719	48.98		
変動係数	%	-	40.12	11.89	4.69	8.28		
相対値*	%	-	101.3	101.3	100.4	117.8		

* 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	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)	
所定濃度	μg/L	0	5	20	100	500	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.287	1.142	0.729	0.324	0.133
	2	-	1.461	1.174	0.747	0.317	0.132
	3	-	1.351	1.152	0.709	0.331	0.132

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

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.38	1.01	20.9	0.0898	-

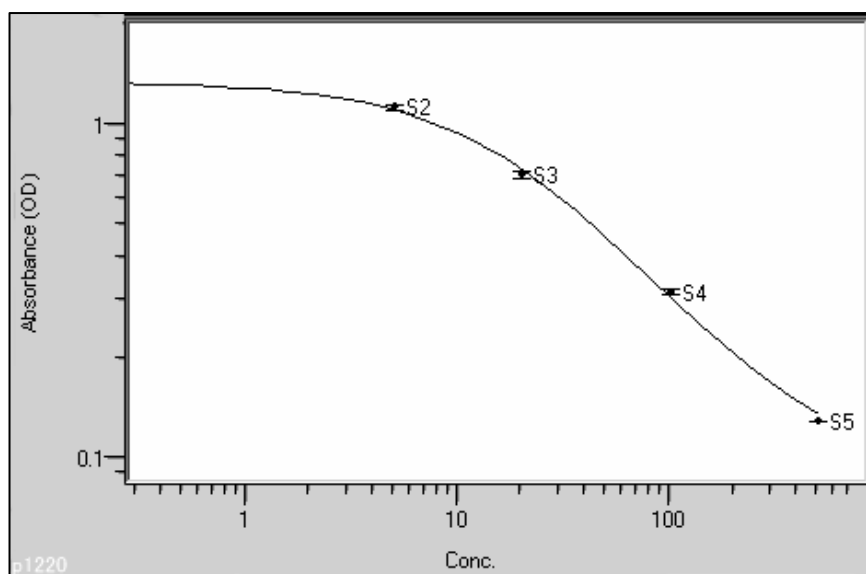


図 5.1.2 検量線

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	5	5	5	5	5	5	5	5	
実測回数	回	1	2	3	4	5	6	7	8	
ELISA 実測	吸光度	-	1.155	1.107	1.109	1.108	1.088	1.074	1.125	1.048
	換算値	μg/L	4.508	5.712	5.659	5.685	6.219	6.605	5.248	7.351
標準偏差	μg/L	0.862								

検出下限 (3SD) = 2.586

定量下限 (10SD) = 8.620

(3) 繰返し再現性
検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.7 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)	
所定濃度	μg/L	0	5	20	100	500	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	0.993	0.869	0.654	0.302	0.140
	2	-	0.988	0.836	0.620	0.280	0.125
	3	-	1.009	0.916	0.633	0.291	0.124

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

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	0.998	1.06	29.5	0.0916	-

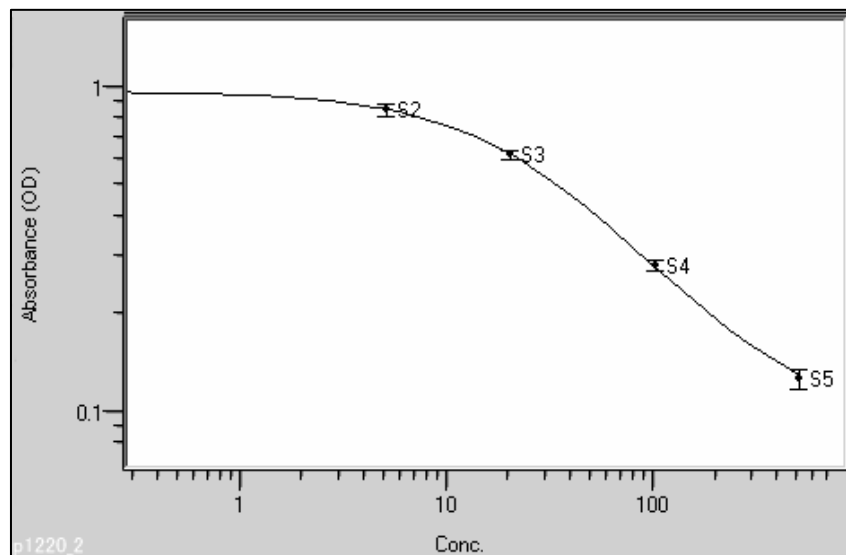


図 5.1.3 検量線

試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.9 対象物質試料溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液									
		溶液 S3									
調製濃度	µg/L	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
実測回数	回	1	2	3	4	5	6	7	8		
ELISA 実測	吸光度	1	-	0.643	0.653	0.640	0.632	0.614	0.599	0.613	0.623
		2	-	0.669	0.657	0.676	0.626	0.605	0.613	0.635	0.589
		3	-	0.657	0.653	0.679	0.634	0.648	0.640	0.643	0.601
		平均	-	0.656	0.654	0.665	0.630	0.622	0.617	0.630	0.604
換算値	µg/L	18.37	18.53	17.68	20.55	21.30	21.76	20.58	23.00		
標準偏差	µg/L	1.861									
変動係数	%	9.20									

(4) 日間再現性

検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.10.1 検量線用標準溶液の測定データ (1日)

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)	
所定濃度	µg/L	0	5	20	100	500	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.097	1.009	0.675	0.338	0.145
	2	-	1.101	0.928	0.683	0.309	0.138
	3	-	1.124	0.942	0.678	0.328	0.130

表 5.1.11.1 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D) / (1 + (X / C)^B)$ の場合] (1日)

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.11	0.995	28.1	0.0897	-

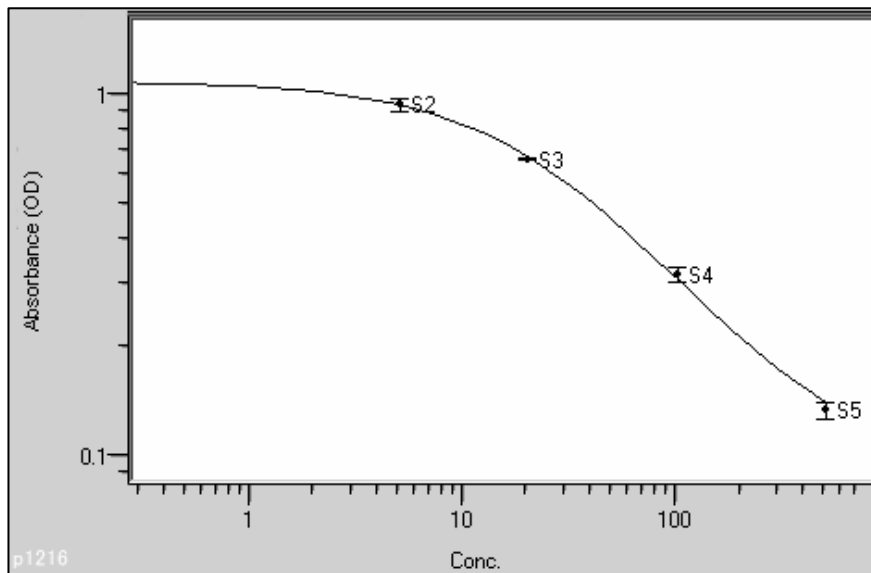


図 5.1.4.1 検量線 (1日)

表 5.1.10.2 検量線用標準溶液の測定データ (2日)

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)	
所定濃度	µg/L	0	5	20	100	500	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.495	1.178	0.807	0.356	0.140
	2	-	1.304	1.081	0.720	0.311	0.128
	3	-	1.343	1.122	0.742	0.312	0.130

表 5.1.11.2 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D) / (1 + (X / C)^B)$ の場合] (2日)

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.38	0.981	21.6	0.0826	-

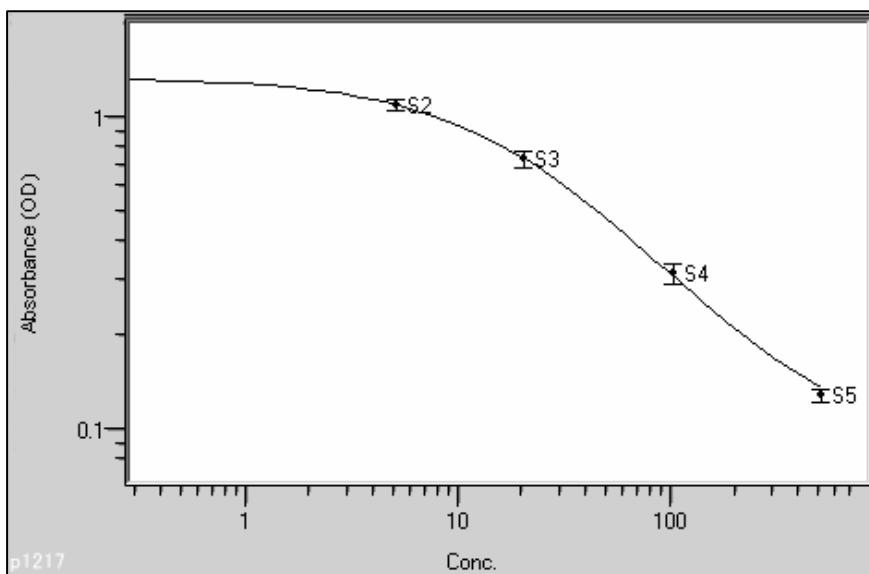


図 5.1.4.2 検量線 (2 日)

表 5.1.10.3 検量線用標準溶液の測定データ (3 日)

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)	
所定濃度	μg/L	0	5	20	100	500	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.059	0.880	0.684	0.329	0.139
	2	-	1.102	0.884	0.630	0.285	0.123
	3	-	1.129	0.926	0.647	0.290	0.125

表 5.1.11.3 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D) / (1 + (X / C)^B)$ の場合] (3 日)

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.09	0.949	25.5	0.0789	-

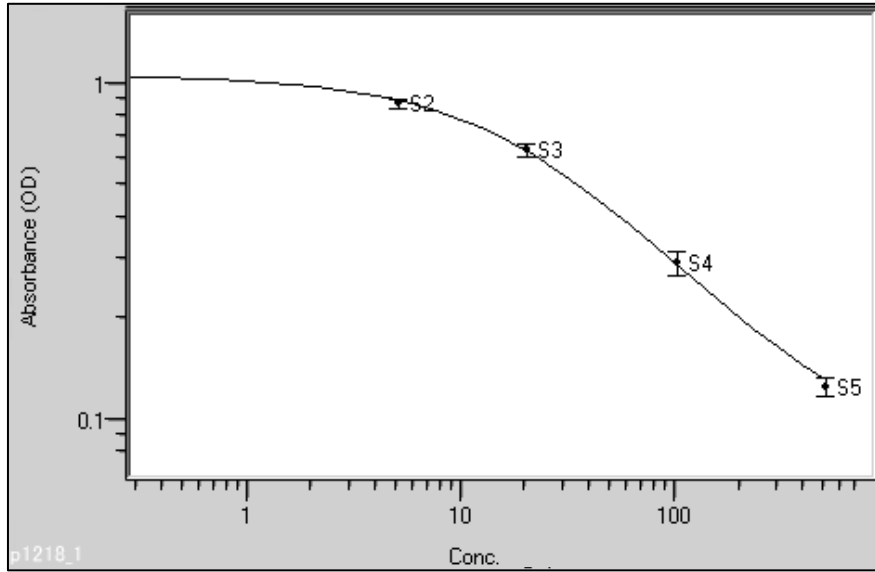


図 5.1.4.3 検量線 (3 日)

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			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	0	5	5	5	20	20	20	100	100	100	500	500	500		
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
ELISA 実測	吸光度	1	-	1.202	1.369	1.049	0.979	1.112	0.917	0.688	0.752	0.644	0.312	0.314	0.277	0.138	0.127	0.122
		2	-	1.228	1.417	1.049	0.896	1.085	0.931	0.653	0.722	0.615	0.308	0.294	0.272	0.133	0.123	0.119
		3	-	1.284	1.386	1.088	0.992	1.135	0.889	0.711	0.784	0.654	0.324	0.314	0.283	0.140	0.128	0.126
	平均	-	1.238	1.391	1.062	0.956	1.111	0.912	0.684	0.753	0.638	0.315	0.307	0.277	0.137	0.126	0.122	
換算値	µg/L			0.705	5.063	5.589	5.146	20.27	20.31	20.65	100.4	106.6	113.4	588.9	668.6	674.4		
標準偏差	µg/L		-		0.283			0.210			6.471			47.75				
変動係数	%		-		5.37			1.03			6.06			7.42				

(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 5.1.13.1 検量線用標準溶液の測定データ (0 ヶ月)

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)	
所定濃度	µg/L	0	5	20	100	500	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.059	0.880	0.684	0.329	0.139
	2	-	1.102	0.884	0.630	0.285	0.123
	3	-	1.129	0.926	0.647	0.290	0.125

表 5.1.14.1 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D) / (1 + (X / C)^B)$ の場合]

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.09	0.949	25.5	0.0789	-

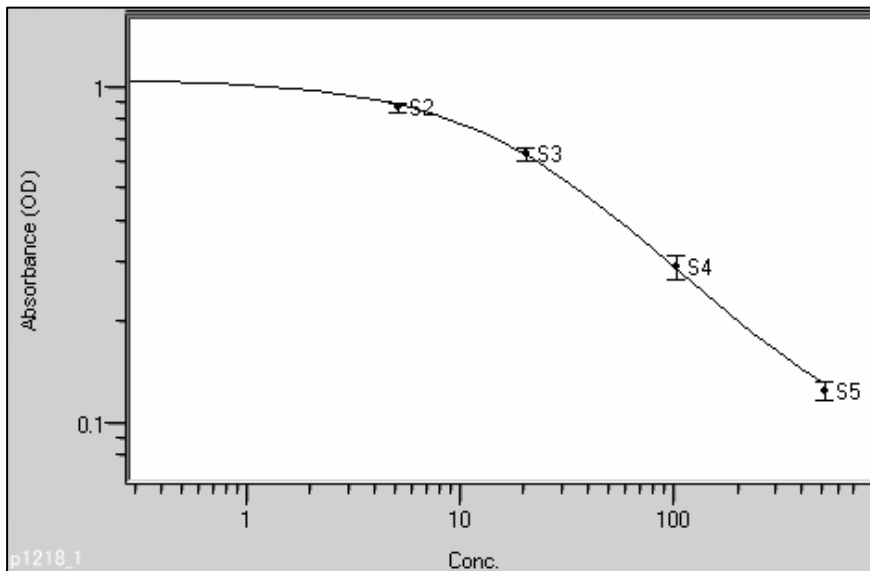


図 5.1.5.1 検量線

表 5.1.13.2 検量線用標準溶液の測定データ(1ヵ月)

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)	
所定濃度	µg/L	0	5	20	100	500	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.381	1.193	0.775	0.327	0.136
	2	-	1.396	1.196	0.828	0.328	0.135
	3	-	1.472	1.203	0.806	0.314	0.133

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

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.42	1.07	22.9	0.0928	-

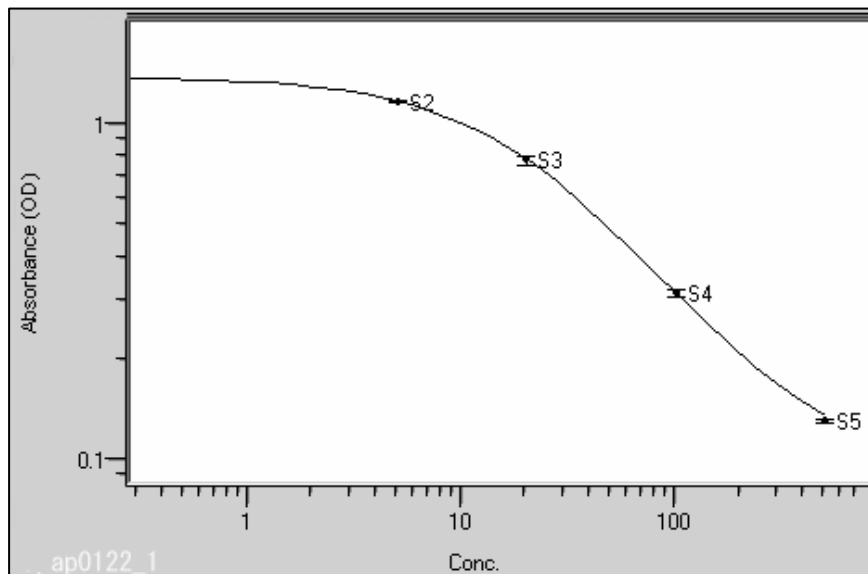


図 5.1.5.2 検量線

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 5.1.15 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		溶液 S5		
		0ヶ月	1ヶ月	0ヶ月	1ヶ月	0ヶ月	1ヶ月	0ヶ月	1ヶ月	0ヶ月	1ヶ月	
調製濃度	µg/L	0	0	5	5	20	20	100	100	500	500	
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 吸光度	1	-	1.049	1.408	0.917	1.184	0.644	0.754	0.277	0.319	0.122	0.130
	2	-	1.049	1.527	0.931	1.223	0.615	0.792	0.272	0.317	0.119	0.134
	3	-	1.088	1.489	0.889	1.187	0.654	0.766	0.283	0.315	0.126	0.130
	平均	-	1.062	1.475	0.912	1.198	0.638	0.771	0.277	0.317	0.122	0.131
換算値	µg/L	0.705	-	5.146	5.098	20.65	21.950	113.4	100.9	674.4	601.8	
標準偏差	µg/L	0.515	-	0.783	0.556	1.784	1.190	4.113	1.010	59.76	33.55	
変動係数	%	71.36	-	15.17	10.89	8.62	5.41	3.62	1.00	8.82	5.56	

(6) プレート間再現性

検量線作成記録

表 5.1.16.1 検量線用標準溶液の測定データ(プレート A)

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)	
所定濃度	µg/L	0	5	20	100	500	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.059	0.880	0.684	0.329	0.139
	2	-	1.102	0.884	0.630	0.285	0.123
	3	-	1.129	0.926	0.647	0.290	0.125

表 5.1.17.1 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D) / (1 + (X / C)^B)$ の場合]
(プレート A)

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.09	0.949	25.5	0.0789	-

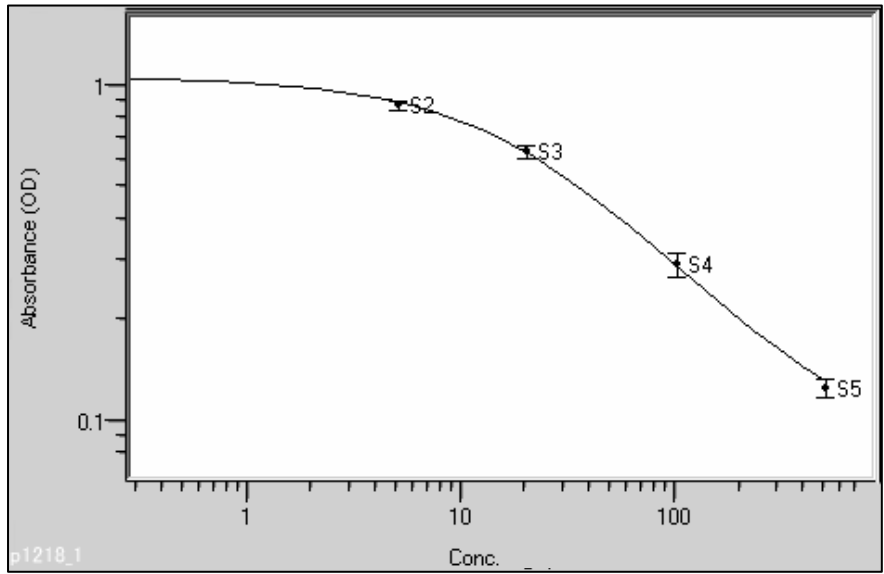


図 5.1.6.1 検量線 (プレート A)

表 5.1.16.2 検量線用標準溶液の測定データ(プレート B)

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)	
所定濃度	μg/L	0	5	20	100	500	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.411	1.070	0.729	0.308	0.134
	2	-	1.438	1.069	0.766	0.304	0.132
	3	-	1.241	1.075	0.687	0.290	0.131

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

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.36	0.975	19.4	0.0859	-

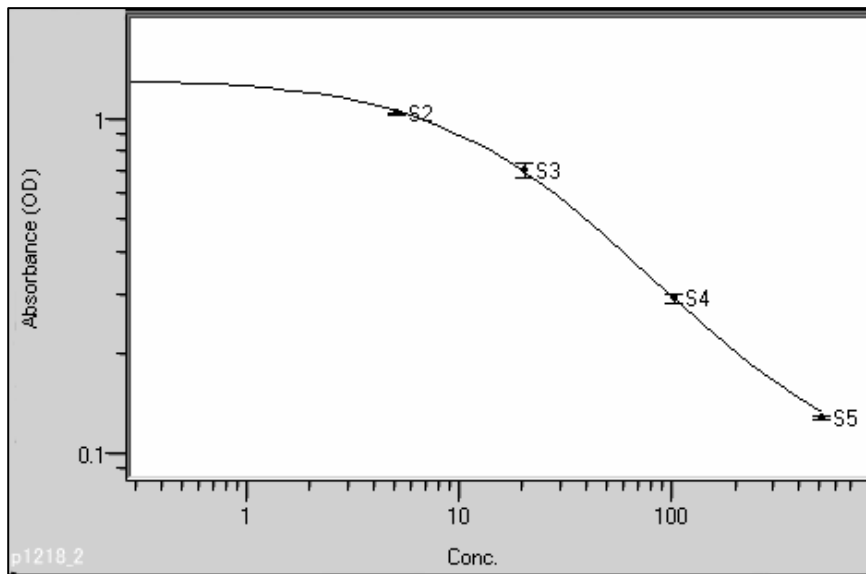


図 5.1.6.2 検量線 (プレート B)

表 5.1.16.3 検量線用標準溶液の測定データ(プレート C)

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)	
所定濃度	µg/L	0	5	20	100	500	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	0.960	0.896	0.620	0.303	0.122
	2	-	1.066	0.844	0.613	0.264	0.117
	3	-	1.060	0.842	0.585	0.290	0.121

表 5.1.17.3 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D) / (1 + (X / C)^B)$ の場合]
(プレート C)

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.03	0.96	25.5	0.0748	-

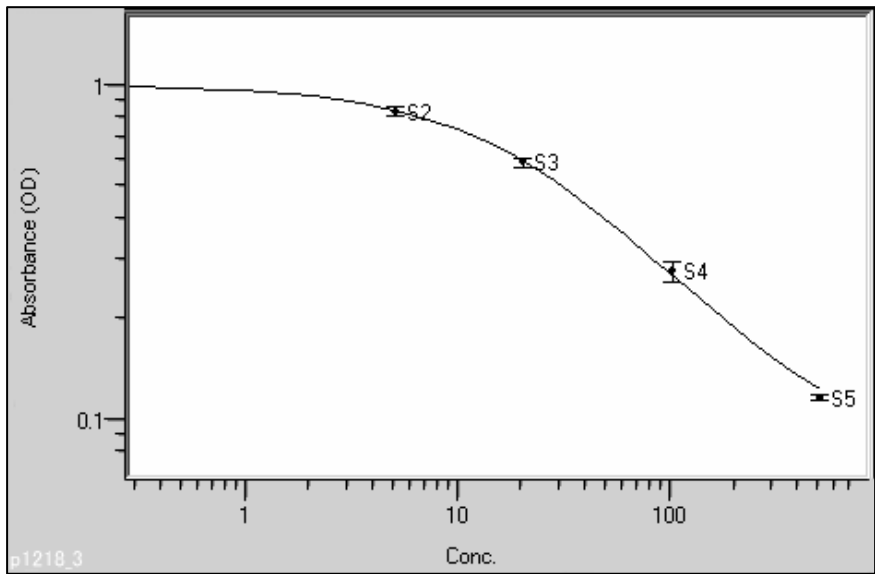


図 5.1.6.3 検量線 (プレート C)

試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは、以下に示すとおりである。

(A,C:同一ロット、B:異なるロット)

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			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	0	5	5	5	20	20	20	100	100	100	500	500	500		
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
ELISA 実測	吸光度	1	-	1.049	1.280	1.000	0.917	1.143	0.872	0.644	0.746	0.646	0.277	0.309	0.278	0.122	0.135	0.115
		2	-	1.049	1.314	1.026	0.931	1.039	0.819	0.615	0.710	0.628	0.272	0.308	0.287	0.119	0.135	0.121
		3	-	1.088	1.348	1.011	0.889	1.110	0.848	0.654	0.684	0.596	0.283	0.314	0.266	0.126	0.132	0.125
	平均	-	1.062	1.314	1.012	0.912	1.097	0.846	0.638	0.713	0.623	0.277	0.310	0.277	0.122	0.134	0.120	
換算値	µg/L	0.705	0.682	0.441	5.146	4.886	5.763	20.65	20.06	18.75	113.4	94.65	100.6	674.4	539.3	579.2		
標準偏差	µg/L	0.146			0.450			0.975			9.567			69.39				
変動係数	%	24.00			8.56			4.92			9.30			11.61				

(7) 交差反応性

-1 検量線作成記録(直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム試験用)

表 5.1.19.1 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)	
所定濃度	g/L	0	5	20	100	500	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.564	1.279	0.814	0.343	0.133
	2	-	1.495	1.242	0.749	0.298	0.122
	3	-	1.575	1.187	0.772	0.305	0.125

表 5.1.20.1 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D) / (1 + (X / C)^B)$ の場合]

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.55	1	18.3	0.0815	-

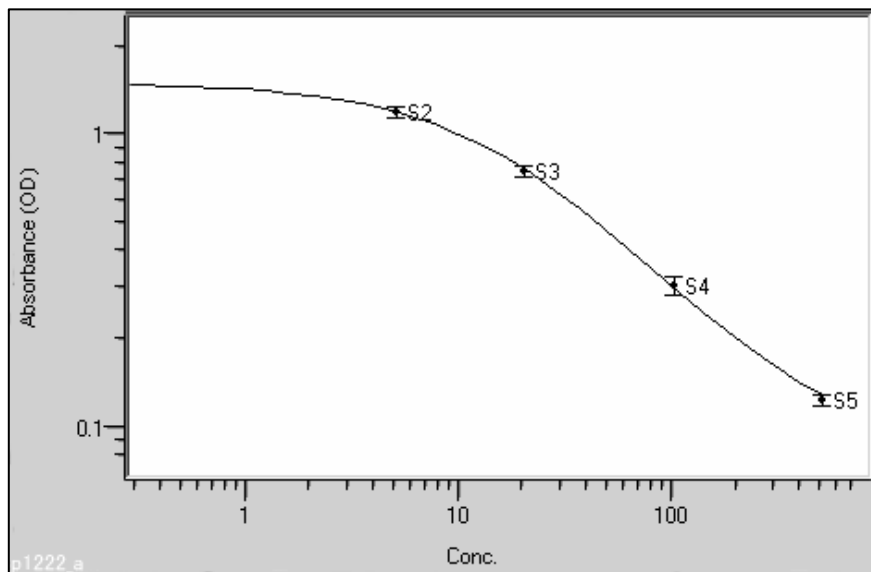


図 5.1.7.1 検量線

-2 検量線作成記録(4-t-オクチルフェノール試験用)

表 5.1.19.2 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)	
所定濃度	g/L	0	5	20	100	500	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.160	1.014	0.754	0.337	0.138
	2	-	1.165	1.051	0.732	0.327	0.132
	3	-	1.161	1.027	0.759	0.334	0.141

表 5.1.20.2 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D) / (1 + (X / C)^B)$ の場合]

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.16	1.08	30.9	0.0922	-

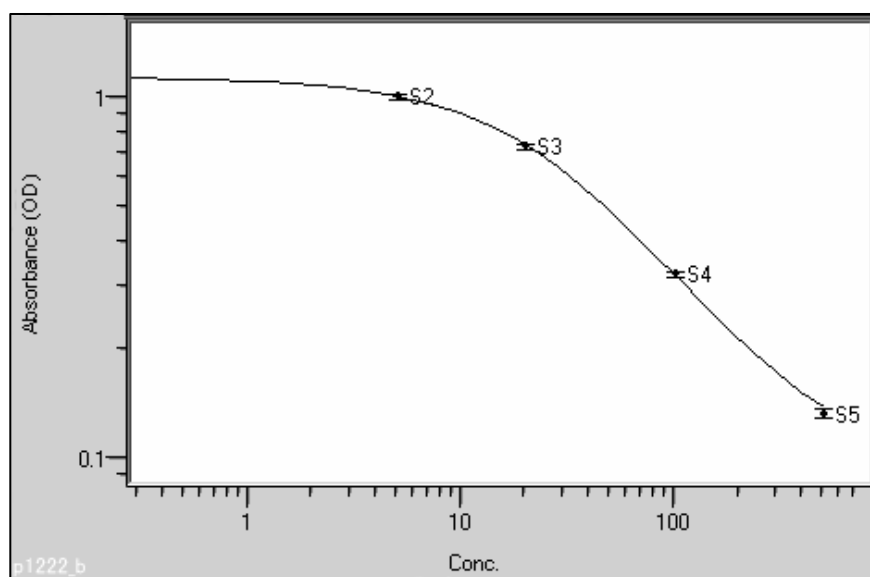


図 5.1.7.2 検量線

試験結果記録

- 1 直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム

表 5.1.21 交差反応性物質（直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム）の測定データ

項目	単位	試料溶液						
		プレート ブランク	ブランク	溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4	
所定濃度	Mg/L	-	0	0.2	0.8	4	20	
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	0.062	1.381	1.486	1.347	1.317	0.880
	2	-	0.063	1.385	1.422	1.544	1.530	0.943
	3	-	0.063	1.445	1.435	1.448	1.446	0.902

表 5.1.22 4-ノニルフェノールの測定データ

項目	単位	試料溶液						
		プレート ブランク	ブランク	溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4	
所定濃度	µg/L	-	0	5	20	100	500	
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	0.062	1.468	1.204	0.873	0.312	0.126
	2	-	0.063	1.362	1.177	0.735	0.318	0.130
	3	-	0.063	1.494	1.191	0.798	0.331	0.128

4-ノニルフェノールの吸光度曲線

$$\text{吸光度} = (1.44 - 0.0818) / (1 + (X/22.2)^{1.04}) + 0.0818 \dots \dots \dots$$

X=0 の時の吸光度： 1.44 (吸光度の最大値) ……………

プレートブランク： 0.063 (吸光度の最小値) ……………

より、4-ノニルフェノールの 50%発色阻害の吸光度 = 0.751

直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムは、今回設定した濃度範囲では発色の阻害が弱く、吸光度曲線が求められなかった。

そこで、20mg/L の時の吸光度 = 0.908 のとき、便宜的に 4-ノニルフェノールの最大吸光度 を直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムでも最大とみなすと、

$$\text{発色阻害率} = 38.6\% \dots \dots \dots$$

より、

4-ノニルフェノールで発色阻害率 38.6% (吸光度：0.908) の濃度 = 14.53µg/L ……

より、

$$\text{発色阻害率 (38.6\%)} \text{ を用いた交差反応率} : 14.53/20000 \times 100 = 0.07\% \quad (= < 0.1\%)$$

- 2 4-t-オクチルフェノール

表 5.1.23 交差反応性物質 (4-t-オクチルフェノール) の測定データ

項目	単位	試料溶液						
		プレート ブランク	ブランク	溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4	
所定濃度	μg/L	-	0	5	20	100	500	
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	0.066	1.192	0.996	0.705	0.333	0.134
	2	-	0.068	1.133	0.951	0.678	0.331	0.137
	3	-	0.065	1.091	0.930	0.646	0.323	0.134

表 5.1.24 4-ノニルフェノールの測定データ

項目	単位	試料溶液						
		プレート ブランク	ブランク	溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4	
所定濃度	μg/L	-	0	5	20	100	500	
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	0.066	1.150	0.965	0.736	0.336	0.142
	2	-	0.068	1.071	0.929	0.644	0.331	0.139
	3	-	0.065	1.197	1.068	0.732	0.321	0.143

4-ノニルフェノールの吸光度曲線

$$\text{吸光度} = (1.14 - 0.0943) / (1 + (X/28.2)^{1.02}) + 0.0943 \dots\dots\dots$$

4-t-オクチルフェノールの吸光度曲線

$$\text{吸光度} = (1.14 - 0.0808) / (1 + (X/26.6)^{0.944}) + 0.0808 \dots\dots\dots$$

X=0 の時の吸光度： とも 1.14 (吸光度の最大値).....

プレートブランク： 0.066 (吸光度の最小値).....

より、

4-ノニルフェノール、4-t-オクチルフェノールの 50%発色阻害の吸光度 = 0.603...

より、4-ノニルフェノールの 50%発色阻害濃度：29.74μg/L

より、4-t-オクチルフェノールの 50%発色阻害濃度：27.40μg/L

交差反応率 (%) : $29.74/27.40 \times 100 = 108.5\%$

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	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)	
所定濃度	μg/L	0	5	20	100	500	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.374	1.182	0.758	0.323	0.134
	2	-	1.511	1.193	0.757	0.292	0.122
	3	-	1.322	1.115	0.737	0.310	0.127

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

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.41	1.04	20.6	0.0867	-

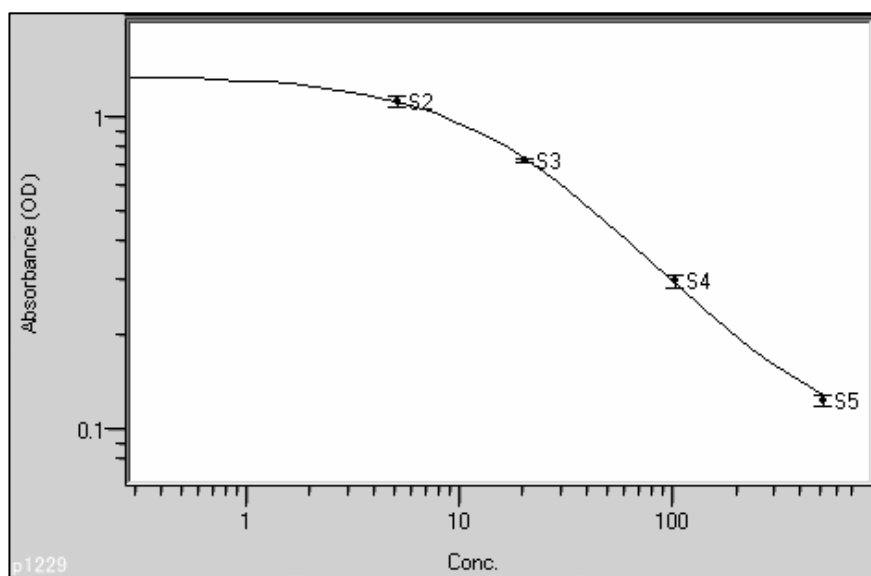


図 5.2.1 検量線

試験結果

河川水に測定範囲の中央付近（最終濃度：20 μ g/L）のノニルフェノールを添加し、さらにフミン酸ナトリウムを添加（最終濃度：0,1,5,10,50mg/L）した試験用試料溶液の測定結果は、以下のとおりであった。

表 5.2.3 試料溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液						
		ノニルフェノール 20 μ g/L 添加河川水						
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	-	0.849	0.847	0.735	0.519	0.181
		2	-	0.795	0.799	0.817	0.554	0.198
		3	-	0.808	0.793	0.798	0.535	0.208
		平均	-	0.817	0.813	0.783	0.536	0.196
	換算値	μ g/L	16.759	16.975	18.520	38.994	210.033	
	回収率	%	83.8	84.9	92.6	195	1050	

フミン酸ナトリウム 10mg/L 以上では、明らかに正の誤差が認められた。

(2) 測定精度等

検量線作成記録

表 5.2.4 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)	
所定濃度	μg/L	0	5	20	100	500	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	0.969	0.859	0.634	0.287	0.123
	2	-	1.037	0.904	0.642	0.293	0.128
	3	-	1.040	0.938	0.700	0.333	0.137

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

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.02	1.06	31.5	0.0878	-

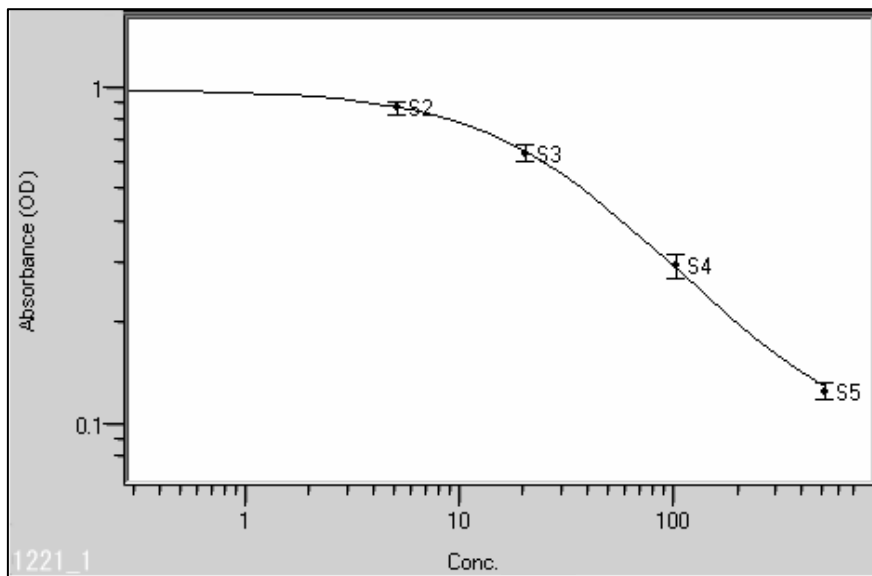


図 5.2.2 検量線

試験結果記録

結果は表 5.2.6 及び表 5.2.7 のとおりである。

ELISA 法では、実試料のままでは、アルキルフェノール類は不検出であったが、機器分析では 3 地点ともアルキルフェノール類のうち、4 - ノニルフェノールが検出され、4 - n - オクチルフェノール及び 4 - t - オクチルフェノールは不検出であった。

なお、試料番号 2 の地点では他地点に比べ試料間のばらつきが大であった。

表 5.2.6 ELISA 法による実試料測定結果

試料番号	吸光度				測定結果 ($\mu\text{g/L}$)
	1 回目	2 回目	3 回目	平均	
S1	1.028	1.041	1.041	1.037	ND
S2	0.992	0.979	1.027	0.999	ND
S3	1.308	0.956	1.070	1.021	ND
検出下限					2.6
定量下限					8.6

表 5.2.7 機器分析による実試料測定結果

試料番号	4-ノニルフェノール			4-n-オクチルフェノール			4-t-オクチルフェノール		
	測定結果 ($\mu\text{g/L}$)	n	標準 偏差	測定結果 ($\mu\text{g/L}$)	n	標準 偏差	測定結果 ($\mu\text{g/L}$)	n	標準 偏差
S1	0.3	3	0.096	ND	3	-	ND	3	-
S2	1.1	3	0.688	ND	3	-	ND	3	-
S3	0.5	3	0.090	ND	3	-	ND	3	-
定量下限	0.1			0.01			0.01		

固相抽出カラムの検討結果

結果は下表のとおりであり、メーカー提供資料の固相抽出カラムの4-ノニルフェノールの脱着能力が確認できた。なお、ELISA法はカラム負荷量に比べ低値の傾向が認められる。

表 5.2.8 固相抽出カラム検討結果

4-ノニルフェノール		
カラム負荷量 (ng)	ELISA 法 (ng)	機器分析 (ng)
0	4.2	不検出
10	5.3	-
20	5.8	-
40	12.4	-
200ng から分取した 20ng	12.9 (回収率 64.5%)	-
400ng から分取した 40ng	24.5 (回収率 61.2%)	-
200ng から分取した 180ng	-	176 (回収率 97.8%)
400ng から分取した 360ng	-	384 (回収率 106%)

実試料の固相抽出法の検討結果

結果は下表のとおりであり、カートリッジ・カラムによる固相抽出法により試料の濃縮操作を行えば、ELISA法で実試料の測定が十分可能であることがわかった。

なお、ELISA法と機器分析とで定量値が完全に合致してはいないが、極端な違いは認められなかった。

表 5.2.9 固相抽出法による実試料測定結果

試料番号	試料名	ELISA 法	機器分析		
		アルキルフェノール類 ($\mu\text{g/L}$)	4-ノニルフェノール ($\mu\text{g/L}$)	4-n-オクチルフェノール ($\mu\text{g/L}$)	4-t-オクチルフェノール ($\mu\text{g/L}$)
S1	一の坂川下流部	0.09 0.10	0.2	ND	ND
S2	前田川、錦川合流後	0.05 0.07	0.2	ND	ND
S3	九田川	0.24 0.12	0.1	ND	ND
	処理 Blank	0.02	ND	ND	ND
	定量限界	-	0.1	0.01	0.01

(注) ELISA法は2回の測定値を記載。

6. 実証試験結果の検討と考察

(1) 製品性能の信頼性

実証試験で実施した基本性能 7 項目の全ての結果から、20 ~ 500 μ g /L の濃度範囲においては、ほぼ妥当な製品性能の信頼性を確認した。

(2) 一般環境モニタリングでの実用性

実試料として河川水を用いた実証試験では、一般の河川でのアルキルフェノール類濃度が本キットの感度に比較し低濃度であることから、適切な前処理を行えば実用化が可能である。

(3) 製品操作等の簡便性

一般環境モニタリングでの使用を想定した場合、試料の前処理がない場合、約 3 時間で測定結果が得られ、前処理を伴う場合約 3 日（機器分析と同程度の日数）で測定結果が得られる。なお、カートリッジカラムによる前処理がない場合、同時に約 25 試料（3 重測定）の測定が可能である。

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

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》環境汚染診断薬エコロジーナ アルキルフェノール（AP）ELISAキット （マイクロプレート）

平成16年12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（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）

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

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、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535
	担当者所属・氏名	企画情報室 室長 古谷 長蔵
	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 シーパンス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。

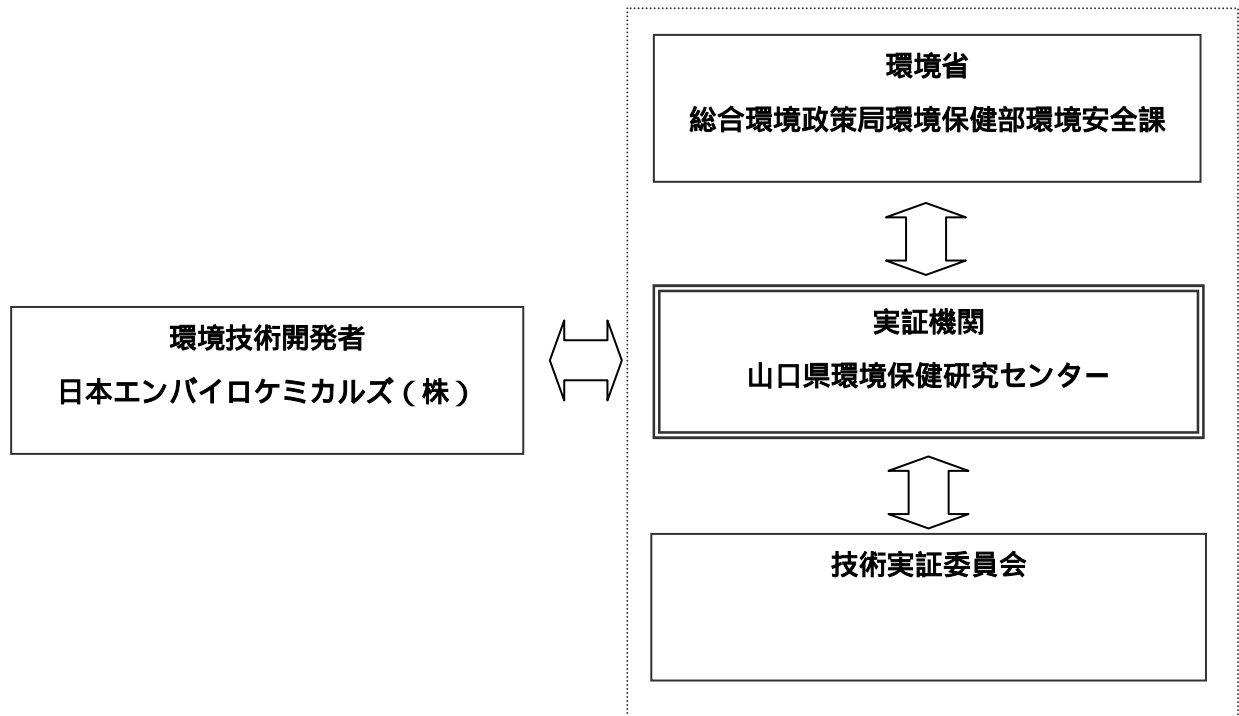


図 2.2 実証試験の実施体制

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	五歩池 一二
	実証試験における ELISA 法の総括責任者	生物学部長	松村 健道
	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	澄田 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	溝田 哲
	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、アルキルフェノール（AP）に対する特異的なモノクローナル抗体を応用した、環境中（対象環境媒体：水質、底質）の AP 測定 ELISA キットである。

ELISA の原理は、競合反応（AP 濃度が高い試料では吸光度が低く、AP 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	環境汚染診断薬エコロジーナ アルキルフェノール（AP）ELISA キット（マイクロプレート）
型番	300-15101《和光純薬工業（株）商品コード》
販売・製造元	《販売》和光純薬工業（株）《製造》日本エンバイロケミカルズ（株）
重量（キット一式、g）	580g
価格（円）	
分析対象物質	アルキルフェノール（ノニルフェノール、オクチルフェノール）
対象環境媒体	水質・底質・生物・その他（ ） 底質試料は抽出操作が必要。
利用用途	環境試料中のアルキルフェノール濃度の測定
標準試薬・種類	付属（調製済 / 調製要） 使用時にノニルフェノール標準液（0, 50, 200, 1000, 5000µg/L : 10%DMSO + 20%メタノール溶液）を各々10倍希釈する。
操作環境（室温）	15 ~ 30 （恒温槽（例 20 ）の使用が望ましい）
製品保管条件	2 ~ 8
製品保証期間	製造後 12 ヶ月間（新製品につき使用期限延長の可能性あり）
同時測定数（最多）	43 試料（n=2 で 1 キット使用時）
測定時間	2.5 時間（固相抽出等の前処理時間を除く）

表 3.2 実証対象製品のデータ (2)

項目	記入欄
1. 基本的な性能	
測定範囲	5 ~ 500µg/L (添付資料 AP-1)
検出下限及び定量下限	定量下限 : 5µg/L (B/B ₀ % = 80 ± 10%)
繰返し再現性	変動係数 : 2.0 ~ 11.0% (標準) (添付資料 AP-2)
日間再現性	
期間再現性	
プレート間再現性	
交差反応性	類縁体等との交差反応性 (添付資料 : AP-3)
その他	自家管理検体% : Low=93.5%、High=108.7%
2. 実用的な性能	
回収特性	
測定精度等	機器分析との相関 : ELISA = 0.80 × GC-MS/MS + 6.6 (R ² = 0.95) (添付資料 AP-4)
その他	
試験責任者	研究開発部 リサーチマネジャー 藤本 茂
試験年月日	平成 16 年 11 月 5 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 16 年 12 月中旬～平成 17 年 1 月下旬とする。また、その期間のスケジュール（予定）は、下表に示すとおりである。

表 4.1 実証試験のスケジュール（予定）

	11月	12月				1月		3月	
	29日	1週	2週	3週	4週	2週	下旬	2週	4週
実証試験計画の策定									
対象技術の選定、計画書案作成									
実証試験計画書策定、承認									
実証試験の実施									
測定範囲の検討									
検出限界及び定量限界の検討									
繰返し再現性の検討									
日間再現性の検討									
期間再現性の検討									
プレート間再現性の検討									
交差反応性の検討									
回収特性の検討									
測定精度の検討									
監査の実施									
実証試験結果取りまとめ									
実証試験中間報告									
技術実証委員会の実施									
報告書の提出									

4.2 実証試験の内容

実証試験項目の内容は、表 4.2 のとおりである。

表 4.2 実証項目の内容

項目	内容
1．基本的な性能	
(1)測定範囲	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いた ELISA 測定値の変動等に基づき、数値的な設定の妥当性を実証する。
(2)検出下限及び定量下限	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の標準偏差に基づき、数値的な設定の妥当性を実証する。
(3)繰返し再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(4)日間再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて異なる条件（日付）での同一操作による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(5)期間再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて製造後一定期間経過した製品の操作による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(6)プレート間再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて異なるロットや異なるプレート間での ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(7)交差反応性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて類似物質別の ELISA 測定値の相違等に基づき、交差反応性を実証する。
2．実用的な性能	
(1)回収特性	提出書類の内容、環境試料を模擬し市販標準品で混合調製した試験用試料（濃度既知）を用いた ELISA 測定値の比較に基づき、回収特性を実証する。
(2)測定精度	環境試料（濃度未知）を用いた ELISA 測定値の変動や操作手順・操作方法の特徴等に基づき、測定精度、前処理妥当性、操作簡便性等による環境試料への適用性を実証する。

4.3 実証対象製品の受け入れと管理

(1) 実証対象製品 (ELISA キット) の受け入れ

受領の記録を ELISA キット管理表 (様式 4.3) に記入し、以下の事項を確認する。

管理表と ELISA キットの品名、数量が一致していること。

ELISA キットの搬送が適切に取り扱われていること。

ELISA キットに不適合又は疑義を発見したときは、適切な処置をとる。

(2) ELISA キットの管理

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

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

ELISA キット管理表 (様式 4.3)

受領年月日 _____ 時 分

番号 (管理番号) _____ - _____

メーカー名 _____

品名 _____

Lot . No. _____

搬入時確認事項

包装等に破損がない

保管温度 ()

搬入時の温度管理

使用期限

その他異常なし

保管場所 _____

保管温度 _____

担当者 _____

(移動・分割等の記録)

番号 (管理番号) _____ - _____

メーカー名 _____

品名 _____

Lot . No. _____

搬入時確認事項

包装等に破損がない

保管温度 ()

搬入時の温度管理

使用期限

その他異常なし

保管場所 _____

保管温度 _____

担当者 _____

(移動・分割等の記録)

4.4 実証試験の方法

基本的な性能試験及び実用的な性能試験において、以下の操作は共通である。

ア．製品の操作

製品の操作にあたっては、製品の取扱説明書を遵守するとともに、「品質管理マニュアル ELISA 法（アルキルフェノール）」の試験操作手順（一般的な事項）に従って行う。

イ．検量線作成用標準溶液の調製

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

ウ．吸光度の測定

吸光度は、マイクロプレートリーダー（パイオ・ラッド社製マイクロプレートリーダーモデル 680）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：パイオ・ラッド社製マイクロプレートマネージャー5/PC）

オ．実測濃度の算出

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

(1) 基本的な性能試験

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

試験用試料溶液の調製

4-ノニルフェノールの市販標準物質（関東化学）を用いて、1%DMSO + 10%メタノールを希釈溶媒として、試験用試料溶液を調製する。

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

表 4.4.1 標準溶液指定系列及び試験用試料溶液

試験項目	物質名	試料溶液調製濃度
標準溶液指定濃度系列	4-ノニルフェノール	0, 5, 20, 100, 500µg/L
測定範囲 日間再現性 期間再現性 プレート間再現性	4-ノニルフェノール	0, 5, 20, 100, 500µg/L
検出下限及び定量下限	4-ノニルフェノール	5µg/L
繰返し再現性	4-ノニルフェノール	20µg/L
交差反応性	Sodium Linear Dodecylbenzene Sulfonate	0, 0.2, 0.8, 4, 20mg/L
	4-t-オクチルフェノール	0, 5, 20, 100, 500µg/L

測定範囲試験

調製した試験用試料溶液を用いて、各調製濃度につき 3 重測定を行い、3 個の吸光度それぞれから求めた実測濃度より、平均値、標準偏差、変動係数を求める。

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

検出下限及び定量下限試験

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

繰返し再現性試験

測定範囲の直線域に調製した試料溶液を 3 重測定で 8 回測定し、得られた 8 個の実測濃度より平均値、標準偏差、変動係数を求める。

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

同ロット (製造年月日が同じ) の2枚のプレートを用いて、1ヶ月以上離れた時期に「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

4-ノニルフェノール及び類似物質(LAS, 4-t-オクチルフェノール) 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。 $(4\text{-ノニルフェノールの } 50\% \text{ 阻害濃度} / \text{類似物質の } 50\% \text{ 阻害濃度}) \times 100 (\%)$ で交差率を求め、類似物質の交差反応性を検討する。

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

(2) 実用的な性能試験

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

回収特性試験

グラスファイバーフィルター（GFC：孔径 1.2 μ m）を用いて、河川水をろ過したろ液を原水とし、それに測定範囲の中央付近となるように市販標準物質（4-ノニルフェノール）を添加するとともに、妨害物質としてフミン酸ナトリウムを一定濃度添加して、試験用試料溶液を調製する。試験用試料溶液の調製濃度（添加濃度）は、表 4.4.2 のとおりである。

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

表 4.4.2 試験用試料溶液

物質名	試料溶液調製濃度
分析対象物質：4-ノニルフェノール	20 μ g/L
妨害物質：フミン酸ナトリウム	0, 1, 5, 10, 50 mg/L

測定精度試験

3地点から採取した河川水について、グラスファイバーフィルターによるろ過及び固相カートリッジを用いた固相抽出法（キットの取扱説明書）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

1. 技術の先進性について

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

技術の先進性

世界に先駆けてアルキルフェノール特異抗体を取得し、ELISAキットの開発に成功、販売を開始した。

特許

「内分泌攪乱物質またはその分解物の免疫学的分析用または濃縮用モノクロナール抗体およびその用途」(PCT 公開：W099/43799、公開日：1999.9.2)

学会発表

小林ら；「ELISA法による内分泌攪乱物質新規測定法の開発」,第50回全国水道研究発表会要旨集,p558(1999)

廣部将人、小林綾子、郷田泰弘、藤本茂、池道彦、藤田正憲、芹澤滋子、白石寛明、森田昌敏；アルキルフェノールのみを定量可能なELISAの開発、環境ホルモン学会第6回研究発表会要旨集、p69(2003)

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。

・PRTR対象物質でもあるアルキルフェノール<AP>(ノニルフェノール<NP>、オクチルフェノール<OP>)は魚類への内分泌かく乱性を国が公表した化学物質で、水環境の実態調査で23~60%と高い割合で検出されており¹⁾、水環境中のAPのモニタリングは極めて重要である。環境省が示した無影響濃度約0.6ppbは、AP ELISAキットと弊社推奨前処理法(固相抽出を用いたワンステップ濃縮法)との組み合わせにより容易に測定できるレベルであり、同前処理法にて機器分析(GC-MS/MS)と良好な相関性が得られている²⁾。AP ELISAキットは多検体同時分析が可能のため、APを簡便かつ安価にモニタリングすることができる。

・欧米でもAPを規制する動きがあり³⁾、US EPAではNPの水環境基準値の設定を進めていることから⁴⁾、世界的にモニタリングに対する関心は高く、簡便な測定ツールが求められている。今回のモデル事業において、分析ツールとしての適合性が認められれば、世界的な展開も期待できる。

・AP ELISAキットの他に、APEを測定するAPE ELISAキット、APEとAPの総量を測定するAP+APE ELISAキットも開発・販売している。これらのキットを単独あるいは組み合わせて使用することにより、目的やニーズに応じたAP類の簡易モニタリングが可能となる。

1) 平成11~15年 内分泌攪乱化学物質における環境実態調査(水環境)について 環境省環境管理局水環境部企画課

2) 廣部ら、第6回環境ホルモン学会要旨集、p69(2003)

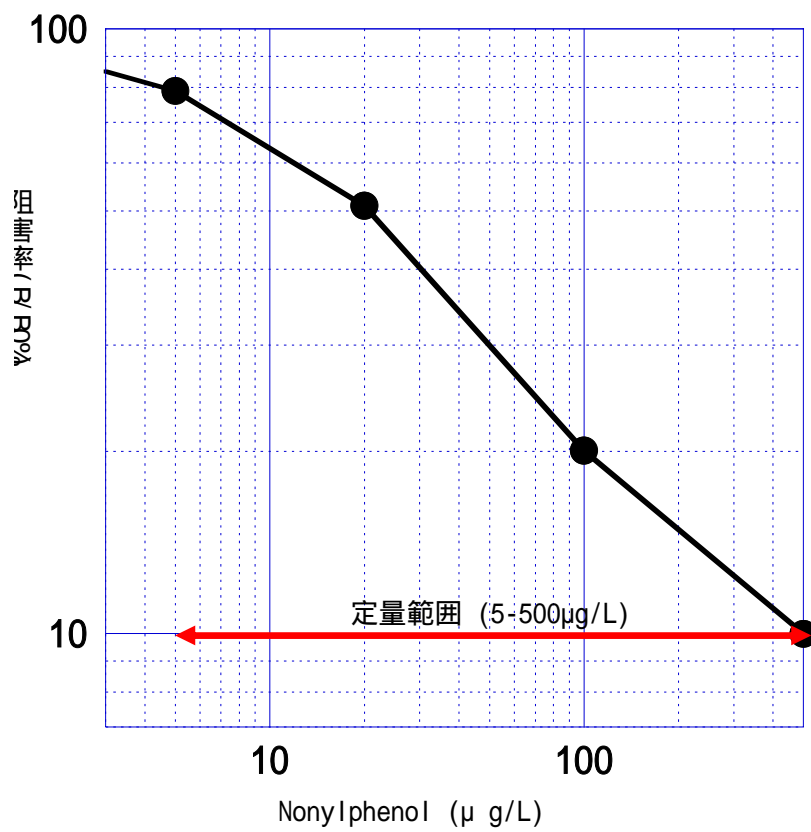
3) EU: NP/NPEの販売および使用を制限(Directive 2003/53/EC)、2005年より各国で規制化へ

(<http://www.defra.gov.uk/environment/chemicals/phenols-va/voluntary-ag.pdf>)

カナダ: NP/NPE使用量50%削減(2007)、95%削減(2010)(http://www.aperc.org/docs/update_cpda051204.ppt)

4) <http://www.epa.gov/waterscience/criteria/nonylphenol/draftfs.htm>

1- 測定範囲



添付資料 AP-2

1- 繰り返し再現性

(1) データ (n=10)

n	0	5	20	100	500
1	1.473	1.283	0.869	0.409	0.137
2	1.472	1.295	0.924	0.400	0.136
3	1.488	1.300	0.908	0.411	0.138
4	1.477	1.300	0.895	0.405	0.140
5	1.477	1.297	0.919	0.414	0.137
6	1.453	1.286	0.904	0.401	0.137
7	1.510	1.296	0.897	0.398	0.134
8	1.460	1.301	0.908	0.391	0.139
9	1.448	1.273	0.877	0.389	0.137
10	1.489	1.245	0.904	0.385	0.136
AVE	1.475	1.288	0.901	0.400	0.137
STD	0.0184	0.0175	0.0171	0.0097	0.0017
CV%	1.25	1.36	1.89	2.43	1.21
B/B0%	100	87.3	61.1	27.1	9.3

(2) 計算値 (n=10) (単位 : $\mu\text{g/L}$)

n	0	5	20	100	500
1	(-)	4.7	22.8	95.0	504.6
2	(-)	4.3	19.4	98.3	510.8
3	(-)	4.2	20.3	94.3	498.5
4	(-)	4.2	21.1	96.5	486.7
5	(-)	4.3	19.7	93.2	504.6
6	0.56	4.6	20.6	98.0	504.6
7	(-)	4.3	21.0	99.1	523.7
8	0.42	4.2	20.3	101.9	492.5
9	0.67	5.0	22.3	102.7	504.6
10	(-)	5.8	20.6	104.3	510.8
AVE	0.55	4.6	20.8	98.3	504.1
STD	0.122	0.5	1.1	3.7	10.2
CV%	22.17	11.0	5.2	3.8	2.0

1- 交差反応性

1. Compounds	Cross Reactivity (%)
Nonylphenol (NP)	100
Octylphenol (OP)	96
Nonylphenol Ethoxylate (NPnEO)	
NP1EO	1.2
NP2EO	2.1
NPnEO (n 5)	3.2
NPnEO (n 7.5)	4.5
NPnEO (n 10)	4.9
Octylphenol Ethoxylate (OPnEO)	
OPnEO (n 10)	2.9
Nonylphenoxy Acetic Acid (NPnEC)	
NP1EC	0.5
NP2EC	1.5
NP3EC	3.8
Anionic Surfactants	
Linear Alkylbenzene Sulfonates (LAS)	<0.1
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	<0.1
Alkylether Sulfate (AES)	<0.1
Sodium Laurate (SOAP)	<0.1

Alkylphenol	Cross Reactivity (%)
4-tertiary-Nonylphenol	100
4-normal-Nonylphenol	<0.1
4-tertiary-Octylphenol	115
4-normal-Octylphenol	2.3
4-normal-Hexylphenol	3.2
4-tertiary-Pentylphenol	7.6
4-normal-Pentylphenol	1.3
4-tertiary-Butylphenol	0.27
4-normal-Butylphenol	<0.1
3-tertiary-Butylphenol	0.35
2-tertiary-Butylphenol	0.14
4-secondary-Butylphenol	2.8
4-Ethylphenol	<0.1

2- 機器分析との相関

