

環境技術実証モデル事業

化学物質に関する簡易モニタリング技術分野

化学物質に関する簡易モニタリング技術
実証試験結果報告書

環境技術開発者	株式会社ホリバ・バイオテクノロジー
技術・製品の名称	《技術名》ELISA法（酵素免疫測定法） 《製品名》マラチオン測定キット

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 惠宣

(要 約)

製品名称	マラチオン測定キット
環境技術開発者	(株) ホリバ・バイオテクノロジー
実証機関	山口県
対象物質	マラチオン
実証試験の実施期間	平成 17 年 1 月 27 日～平成 17 年 2 月 28 日

1. 実証対象技術の概要

本実証対象製品は、マラチオンに特異的な抗体を応用した、環境中のマラチオン測定 ELISA キットである。

ELISA の原理は、競合反応（マラチオン濃度が高い試料では吸光度が低く、マラチオン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	マラチオン測定キット
型番	EL206-00
販売・製造元	株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー
重量 (g)	350 g
価格 (円)	99,750 円
分析対象物質	マラチオン
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 7 ヶ月間
同時測定数	4 6 試料
測定時間	2 ~ 3 時間

4. 実証試験結果の概要

項目	結果概要	
実証機関	山口県	
製品名称	マラチオン測定キット	
環境技術開発者	(株)ホリバ・バイオテクノロジー	
対象物質	マラチオン	
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 17 年 1 月 27 日～平成 17 年 2 月 28 日	
1) 基本的な性能	実験データ	【参考：製品データ】
①測定範囲	調製濃度：15～250 $\mu\text{g/L}$ での相対値： 98.8～143.6%、CV：1.2～9.0%	15～250 $\mu\text{g/L}$
②検出下限及び定量下限	調製濃度 15 $\mu\text{g/L}$ の SD から求めた 検出下限 (3SD)：3.8 $\mu\text{g/L}$ 、 定量下限 (10SD)：12.8 $\mu\text{g/L}$	—
③繰返し再現性	調製濃度 60 $\mu\text{g/L}$ での CV：3.3%、 SD：1.9 $\mu\text{g/L}$	同時再現性 CV：6.3～9.4%
④日間再現性	調製濃度 15～250 $\mu\text{g/L}$ での CV (3日間)： 3.1～9.8%	日間再現性 CV：4.3～13.4%
⑤期間再現性	調製濃度 15～250 $\mu\text{g/L}$ で、1ヶ月を隔てて 2 回測定した値の CV：1ヶ月 1.2～9.0% 1ヶ月後 2.2～4.4%	保存安定性 270 日保存で吸光度 (B/B0) の 変動が 20%以内
⑥プレート間再現性	調製濃度 15～250 $\mu\text{g/L}$ での CV： (同一ロットプレート 2 枚、異ロットプレ ート 1 枚間)：5.3～7.5%	—
⑦交差反応性	交差反応率： フェニトロチオン 0.7% フェノブカルブ <0.1%	交差反応率： フェニトロチオン 0.9% フェノブカルブ <0.1%
2) 実用的な性能		
①回収特性	マラチオンを添加 (60 $\mu\text{g/L}$) した河川水 に、フミン酸トリウムを添加 (0, 1, 5, 10, 50mg/L) した試料の回収率：各々 97.7%、95.9%、 110.1%、119.7%、250.2%	しるねぎに対する添加回収試 験の回収率：109.8～136.1%
②測定精度等	・河川水を直接測定：ELISA 法及び機器分析 とも定量下限未滿 ・公共用水域における水質評価指針値 10 $\mu\text{g/L}$ を考慮し、河川水に 1 $\mu\text{g/L}$ 、5 $\mu\text{g/L}$ 、 10 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 相当添加したときの ELISA 法回収率：452%、156%、145%、124%	—
③その他		
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 15～100 $\mu\text{g/L}$ の濃度範囲において、ほぼ妥当な製品性能の信頼性を確認した。</p> <p>2) 一般環境モニタリングでの実用性：環境試料として河川水にマラチオンを添加した実証試験の結果から、20 $\mu\text{g/L}$ 以上の濃度であれば、水質モニタリング等の実用化が可能である。</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た。同時に約 2.5 試料 (3 重測定) の測定が可能である。 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	18
5.1 基本的な性能	18
(1) 測定範囲	18

(2) 検出下限及び定量下限	19
(3) 繰返し再現性	21
(4) 日間再現性	22
(5) 期間再現性	26
(6) プレート間再現性	28
(7) 交差反応性	32
5.2 実用的な性能	36
(1) 回収特性	36
(2) 測定精度等	38
6. 実証試験結果の検討と考察	42

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

実証試験実施者等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	マラチオン測定キット
実証申請者	株式会社ホリバ・バイオテクノロジー 代表取締役社長 河野 猛
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)
実証試験期間	平成 17 年 1 月 27 日～平成 17 年 2 月 28 日
製品名	マラチオン測定キット
型番	EL206-00
販売・製造元	株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー
重量 (g)	350 g
価格 (円)	99,750 円
分析対象物質	マラチオン
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
製品保証条件	8 ℃以下
製品保証期間	製造後 7 ヶ月間
同時測定数	46 試料
測定時間	2～3 時間

<参 考>

マラチオン

有機りん系殺虫剤 (別名：マラソン、農林業を中心に広く使用)

法規制等の状況

- ・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」
- ・PRTR 法の第 1 種指定化学物質 (政令番号 155)
- ・「公共用水域等における農薬の水質評価指針」(平成 16 年 4 月 15 日環水土第 86 号) 対象農薬 (指針値 0.01mg/l 以下)
- ・水道法に係る水質管理目標設定項目 (目標値 0.05mg/l 以下)

1.2 実証試験結果

(1)基本的な性能

①測定範囲

製品の測定範囲に調製した試験用試料溶液(15,40,100,250 μ g/L)を測定した実測値の相対値は、98.8~143.6%、変動係数は、1.18~8.98%であった。

(製品の測定範囲は、15~250 μ g/L)

②検出下限及び定量下限

製品の測定範囲の下限付近(15 μ g/L)に調製した試験用試料溶液を繰返し(n=8)測定した実測値の標準偏差(SD)から求めた検出下限(3SD)は、3.842 μ g/L、定量下限(10SD)は、12.806 であった。

(製品の測定下限は、15 μ g/L)

③繰返し再現性

製品の測定範囲の直線域(60 μ 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)測定した測定値の変動係数は3.27%(標準偏差 1.911 μ g/L)であった。

(製品の同時再現性試験での変動係数は、6.3~9.4%)

④日間再現性

製品の測定範囲(15~250 μ g/L)に調製した試験用試料溶液を、3日間(1週間以内)測定した実測値(3重測定の平均値)の変動係数は、3.08~9.78%であった。

(製品の日間再現性試験での変動係数は、4.3~13.4%)

⑤期間再現性

製品の測定範囲(15~250 μ 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値をそれぞれ濃度に換算した3つの値の間の変動係数は、0ヶ月・1ヶ月後とも10%以内(1.18~8.98%)であった。

(製品の保存安定性試験のデータは、270日保存で吸光度(B/Bo)の変動が20%以内)

⑥プレート間再現性

製品の測定範囲(15~250 μ g/L)に調製した試験用試料溶液を、同一ロットの2プレート(A,B)と、異なるロット(C:製造年月日はA,Bより5ヶ月前)の1プレートを同日に測定した測定値の変動係数は、5.28~7.55%であった。

(製品のデータは示されていない)

⑦ 交差反応性

交差反応率は、フェニトロチオンは0.7%、フェノブカルブは0.1%未満であった。

(製品の交差反応率のデータは、フェニトロチオン 0.9%、フェノブカルブ < 0.1%)

(2) 実用的な性能

① 回収特性

河川水に測定範囲の中央付近のマラチオン ($60 \mu\text{g/L}$) を添加し、さらにフミン酸ナトリウムを添加 (0, 1, 5, 10, 50 mg/L) した試験用試料溶液の測定結果は、高濃度のフミン酸ナトリウムを添加した試料で、正の誤差がみられた。(50 mg/L のとき、回収率 250.23%)

② 測定精度等

河川水 (3 地点) を測定したところ、ELISA法、機器分析法とも、マラチオンの測定値は定量下限未満であった。

そこで、公共用水域における農薬の水質評価指針値 $10 \mu\text{g/L}$ を考慮し、河川水に $1 \mu\text{g/L}$ 、 $5 \mu\text{g/L}$ 、 $10 \mu\text{g/L}$ 、 $20 \mu\text{g/L}$ 相当のマラチオンを添加してELISA法で測定したところ、回収率は順に 452%、156%、145%、124%であり、実試料で $1 \mu\text{g/L}$ のような低濃度の場合には実際よりかなり高い値を示すが、水質評価指針値付近の濃度はほぼ測定可能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：株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー
代 表 者：代表取締役社長 河野 猛
担当者所属・氏名：試薬事業部 開発・製造部 伊東 茂壽
住 所：京都市南区吉祥院車道町48番地
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 実証対象技術の原理

本実証対象製品は、マラチオンに特異的な抗体を応用した、環境中のマラチオン測定 ELISA キットである。

2.3 実証対象製品のデータ

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	内 容
製品名	マラチオン測定キット
型番	EL206-00
販売・製造元	株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー
重量 (g)	350 g
価格 (円)	99,750 円
分析対象物質	マラチオン
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 7 ヶ月間
同時測定数	46 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

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：山口県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
FAX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 惠宣
実証試験担当者氏名：(ELISA法)生物学部 専門研究員 數田 行雄
専門研究員 吹屋 貞子
(機器分析法)水質部 研 究 員 古谷 典子
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
FAX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) ELISA法

山口県環境保健研究センター 葵庁舎

(2) 機器分析法

山口県環境保健研究センター 大歳庁舎

3.4 実証試験実施期間

平成17年1月27日～平成17年2月28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 (マラチオン)」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求めなかった。

(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

① 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	マラチオン
対象製品名	スマートアッセイシリーズ(環境測定用) マラチオン測定キット(マイクロプレート)
製品番号	ロット番号: K-MLT004E
製造年月日	平成16年12月2日
測定範囲(製品仕様)	15 ~ 250 $\mu\text{g/L}$
試験日時	平成17年1月27日 15:30 ~ 17:40
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎
試験時室内温度	20.0°C~20.7°C
使用した市販標準品	物質名: マラチオン 試薬会社名: 和光純薬工業(株) 製品番号: 138-05513 ロット番号: RWE9466
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

② 試験操作

マラチオン標準品を用い、10%メタノール溶液を希釈溶媒として、試験用試料溶液(0, 15, 40, 100, 250 $\mu\text{g/L}$)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

① 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	マラチオン
対象製品名	スマートアッセイシリーズ(環境測定用) マラチオン測定キット(マイクロプレート)
製品番号	ロット番号: K-MLT004E
製造年月日	平成 16年 12月 2日
測定範囲(製品仕様)	15 ~ 250 $\mu\text{g/L}$
試験日時	平成 17年 1月 27日 15:30 ~ 17:40
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	20.0 $^{\circ}\text{C}$ ~ 20.7 $^{\circ}\text{C}$
使用した市販標準品	物質名: マラチオン 試薬会社名: 和光純薬工業(株) 製品番号: 138-05513 ロット番号: RWE9466
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

② 試験操作

マラチオン標準品を用い、10%メタノールを希釈溶媒として、試験用試料溶液(15 $\mu\text{g/L}$: 測定範囲の下限付近濃度)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

① 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	マラチオン
対象製品名	スマートアッセイシリーズ(環境測定用) マラチオン測定キット(マイクロプレート)
製品番号	ロット番号: K-MLT004E
製造年月日	平成16年 12月 2日
測定範囲(製品仕様)	15 ~ 250 $\mu\text{g/L}$
試験日時	平成17年 1月31日 11:15 ~ 13:20
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎
試験時室内温度	18.4. $^{\circ}\text{C}$ ~19.1 $^{\circ}\text{C}$
使用した市販標準品	物質名: マラチオン 試薬会社名: 和光純薬工業(株) 製品番号: 138-05513 ロット番号: RWE9466
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

② 試験操作

マラチオン標準品を用い、10%メタノールを希釈溶媒として、試験用試料溶液(60 $\mu\text{g/L}$: 測定範囲の直線付近濃度)を調製した。調製した試験用試料溶液を3重測定で8回測定し、得られた8個の実測濃度より平均値、標準偏差、変動係数を求めた。求めた変動係数から、繰返し再現性について検討した。

(4) 日間再現性

① 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	マラチオン
対象製品名	スマートアッセイシリーズ(環境測定用) マラチオン測定キット(マイクロプレート)
製品番号	ロット番号: K-MLT004E
製造年月日	平成16年 12月 2日
測定範囲(製品仕様)	15 ~ 250 $\mu\text{g/L}$
試験日時	平成17年1月27日 15:30 ~ 17:40 平成17年1月29日 12:55 ~ 14:55 平成17年1月31日 11:15 ~ 13:20
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎
試験時室内温度	20.0°C~20.7°C (1/16) 20.4°C~20.6°C (1/17) 18.4°C~19.1°C (1/18)
使用した市販標準品	物質名: マラチオン 試薬会社名: 和光純薬工業(株) 製品番号: 138-05513 ロット番号: RWE9466
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

② 試験操作

同一測定者が1週間のうちの異なる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

① 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	マラチオン
対象製品名	スマートアッセイシリーズ(環境測定用) マラチオン測定キット(マイクロプレート)
製品番号	ロット番号: K-MLT004E
製造年月日	平成 16年 12月 2日
測定範囲(製品仕様)	15 ~ 250 μ g/L
試験日時	平成 17年 1月 27日 15:30 ~ 17:40 平成 17年 2月 28日 11:32 ~ 13:20
試験時室内温度	20.0 ~ 20.7 $^{\circ}$ C 18.0 ~ 18.9 $^{\circ}$ C
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎
使用した市販標準品	物質名: マラチオン 試薬会社名: 和光純薬工業(株) 製品番号: 138-05513 ロット番号: RWE9466
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

② 試験操作

同一ロットのプレートをを用い、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

① 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	マラチオン
対象製品名	スマートアッセイシリーズ(環境測定用) マラチオン測定キット(マイクロプレート)
製品番号	ロット番号: K-MLT004E、K-MLT003E
製造年月日	平成16年12月2日(K-MLT004E)、平成16年7月28日(K-MLT003E)
測定範囲(製品仕様)	15 ~ 250 μ g/L
試験日時	平成17年1月29日 10:50 ~17:00
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎
試験時室内温度	19.1 ~ 20.9 $^{\circ}$ C
使用した市販標準品	物質名: マラチオン 試薬会社名: 和光純薬工業(株) 製品番号: 138-05513 ロット番号: RWE9466
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

② 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

① 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	マラチオン
対象製品名	スマートアッセイシリーズ(環境測定用) マラチオン測定キット(マイクロプレート)
製品番号	ロット番号: K-MLT004E
製造年月日	平成16年12月2日
測定範囲(製品仕様)	15 ~ 250 μ g/L
試験日時	平成17年2月3日 13:25 ~ 15:35 平成17年2月4日 11:40 ~ 13:50
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎
試験時室内温度	19.8 ~ 20.4 $^{\circ}$ C (2/3) 19.5 ~ 20.5 $^{\circ}$ C (2/4)
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

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	マラチオン	和光純薬工業(株)	残留農薬試験用	min. 98.0%	138-05513	RWE9466
類似物質	フェニトロチオン	和光純薬工業(株)	残留農薬試験用	min. 98.0%	132-05533	RWE9339
	フェノブカルブ	和光純薬工業(株)	残留農薬試験用	min. 98.0%	023-06773	RWE9394

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	フェニトロチオン	0, 1.5, 4, 10, 25 mg/L
	フェノブカルブ	0, 4, 10, 25, 60 mg/L

② 試験操作

マラチオン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。（マラチオンの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

① 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	マラチオン
対象製品名	スマートアッセイシリーズ(環境測定用) マラチオン測定キット(マイクロプレート)
製品番号	ロット番号: K-MLT004E
製造年月日	平成16年12月2日
測定範囲(製品仕様)	15 ~ 250 μ g/L
試験日時	平成17年 2月 8日 15:40 ~ 17:35
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	20.9 ~ 20.8 $^{\circ}$ C
使用した市販標準品	物質名: マラチオン 試薬会社名: 和光純薬工業(株) 製品番号: 138-05513 ロット番号: RWE9466
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(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 4.3.2 使用した河川水

試料番号	地点名	採水日	採水量	備考
S1	仁保川	平成17年1月31日	4L \times 1本	pH 6.9 COD 0.9mgO/L

② 試験操作

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マラチオンを添加(60 μ g/L)するとともに、環境試料を想定した妨害物質としてフミン酸ナトリウムを添加(0, 1, 5, 10, 50 mg/L)して、試験用試料溶液を調製した。なお、フミン酸ナトリウムは、含量50~60%の表示であったことから、平均含量55%として試料の調製を行った。

調製した試験用試料溶液について、3重測定した実測濃度から回収率を求め、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

(2)-1 実試料分析

① 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	マラチオン
対象製品名	スマートアッセイシリーズ(環境測定用) マラチオン測定キット(マイクロプレート)
製品番号	ロット番号: K-MLT004E
製造年月日	平成16年12月2日
測定範囲(製品仕様)	15 ~ 250 μ g/L
試験日時	平成17年2月1日 11:25 ~ 13:25
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	18.3 ~ 18.5 $^{\circ}$ C
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2/1) 山口県環境保健研究センター水質部研究員 古谷典子(機器分析法) 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)

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	仁保川	平成17年1月31日	4L \times 2本	pH 6.9 COD 0.9mgO/L
S2	問田川	平成17年1月31日	4L \times 2本	pH 7.2 COD 1.7mgO/L
S3	九田川	平成17年1月31日	4L \times 2本	pH 7.2 COD 2.4mgO/L

② 試験操作

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。

ELISA用の試料は、メタノールを添加(最終濃度10%)してそのまま測定し、機器分析は試料を固液抽出後GC/MS法により測定した。

(2)-2 実試料添加試験

① 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 4.3.5 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	マラチオン
対象製品名	スマートアッセイシリーズ(環境測定用) マラチオン測定キット(マイクロプレート)
製品番号	ロット番号: K-MLT004E
製造年月日	平成16年12月2日
測定範囲(製品仕様)	15 ~ 250 μ g/L
試験日時	平成17年2月18日 17:30 ~ 19:30
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎(ELISA法)
試験時室内温度	21.1 ~ 20.9 $^{\circ}$ C
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 数田行雄(ELISA法2/18)

表 4.3.6 使用した環境試料

試料番号	地点名	採水日	採水量	備考
S1	仁保川	平成17年1月31日	4L \times 1本	pH 6.9 COD 0.9mgO/L

② 試験操作

環境調査において、マラチオンの「公共用水域における農薬の水質評価指針」の指針値0.01mg/L(10 μ g/L)のチェックに当ELISAキットが適用できるかどうか確認するため、標準品の添加実験を行った。

河川水(S1)へのマラチオンの添加濃度(最終濃度)は、指針値(10 μ g/L)を考慮し、0、1、5、10、20 μ g/Lとし、ELISA法で3重測定した。

なお、測定時には1/10量のメタノールを添加するため、実際の濃度は0、0.9、4.5、9、18 μ g/L)となる。

また、河川水は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、使用した。

5. 試験結果

5.1 基本的な性能

(1) 測定範囲

① 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	試験用試料溶液					
		ブランク	STD1 (S2)	STD2 (S3)	STD (S4)	STD4 (S5)	
所定濃度	μg/L	0	15	40	100	250	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	—	1.666	1.054	0.710	0.378	0.202
	2	—	1.580	1.027	0.667	0.369	0.183
	3	—	1.576	1.025	0.668	0.374	0.180

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	1.62	1.14	24.5	0.109	—

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)

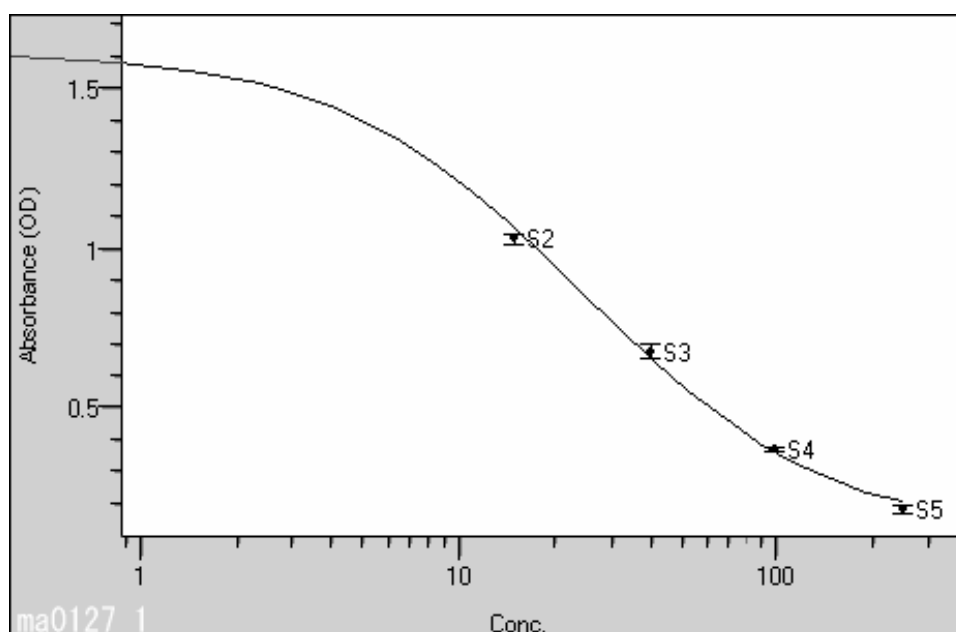


図 5.1.1 検量線

② 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	15	40	100	250		
実測回数	回	3	3	3	3	3		
ELISA 実測	吸光度	1	—	1.548	1.102	0.668	0.343	0.174
		2	—	1.549	1.055	0.659	0.342	0.177
		3	—	1.500	1.031	0.661	0.355	0.179
		平均	—	1.532	1.063	0.663	0.347	0.177
	換算値	μg/L	2.017	15.177	39.513	106.861	358.925	
標準偏差	μg/L	0.633	1.366	0.468	3.340	12.318		
変動係数	%	31.39	8.98	1.18	3.12	3.43		
相対値*	%	—	101.2	98.8	106.9	143.6		

* 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

① 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	試験用試料溶液					
		ブランク	STD1 (S2)	STD2 (S3)	STD3 (S4)	STD4 (S5)	
所定濃度	μg/L	0	15	40	100	250	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	—	1.666	1.054	0.710	0.378	0.202
	2	—	1.580	1.027	0.667	0.369	0.183
	3	—	1.576	1.025	0.668	0.374	0.180

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	1.62	1.14	24.5	0.109	—

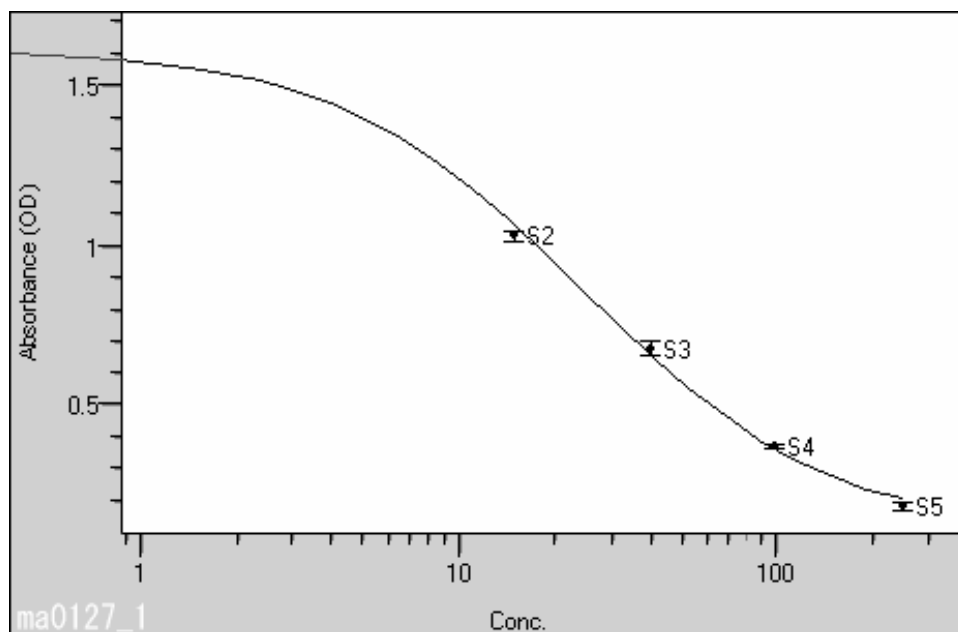


図 5.1.2 検量線

② 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	15	15	15	15	15	15	15	15	
実測回数	回	1	2	3	4	5	6	7	8	
ELISA 実測	吸光度	—	1.053	1.025	1.015	1.021	1.097	1.059	1.092	1.019
	換算値	μg/L	15.549	16.663	17.705	16.827	13.905	15.317	14.086	16.909
標準偏差	μg/L	1.281								

検出下限 (3SD) = 3.842

定量下限 (10SD) = 12.806

(3) 繰返し再現性

① 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	試験用試料溶液					
		ブランク	STD1 (S2)	STD2 (S3)	STD3 (S4)	STD4 (S5)	
所定濃度	μg/L	0	15	40	100	250	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	—	1.586	1.003	0.612	0.322	0.175
	2	—	1.517	0.929	0.595	0.320	0.169
	3	—	1.456	0.921	0.576	0.308	0.161

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	1.53	1.18	21.9	0.107	—

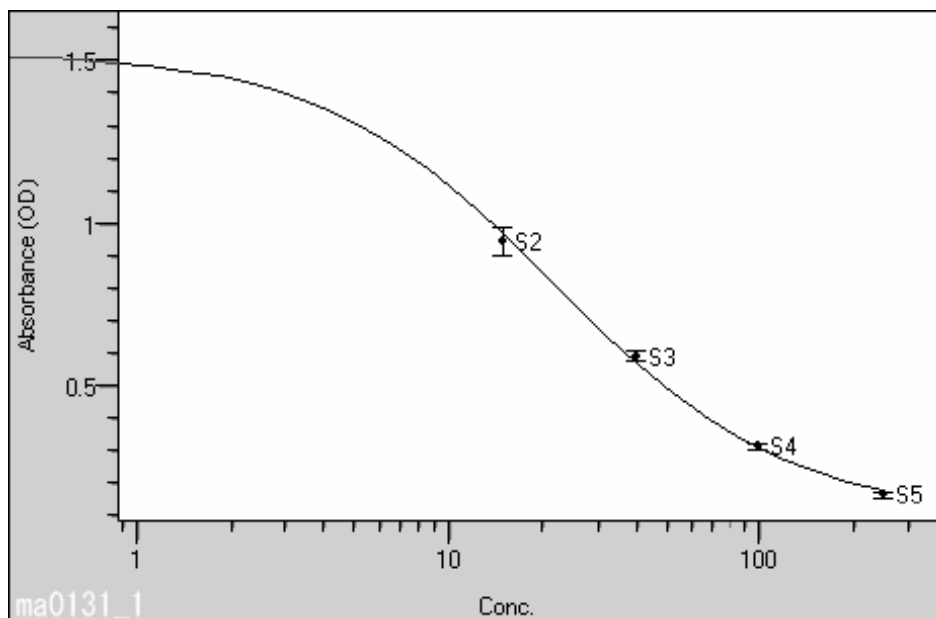


図 5.1.3 検量線

② 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	60	60	60	60	60	60	60	60	60	
実測回数	回	1	2	3	4	5	6	7	8		
ELISA 実測	吸光度	1	—	0.455	0.476	0.479	0.441	0.459	0.469	0.443	0.432
		2	—	0.441	0.448	0.455	0.453	0.442	0.442	0.442	0.415
		3	—	0.444	0.446	0.455	0.448	0.452	0.432	0.445	0.441
		平均	—	0.447	0.457	0.463	0.447	0.451	0.448	0.443	0.429
	換算値	μg/L	58.60	56.73	55.59	58.48	57.78	58.41	59.25	62.10	
標準偏差	μg/L	1.911									
変動係数	%	3.27									

(4) 日間再現性

① 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	試験用試料溶液					
		ブランク	STD1 (S2)	STD2 (S3)	STD3 (S4)	STD4 (S5)	
所定濃度	μg/L	0	15	40	100	250	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	—	1.666	1.054	0.710	0.378	0.202
	2	—	1.580	1.027	0.667	0.369	0.183
	3	—	1.576	1.025	0.668	0.374	0.180

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	1.62	1.14	24.5	0.109	—

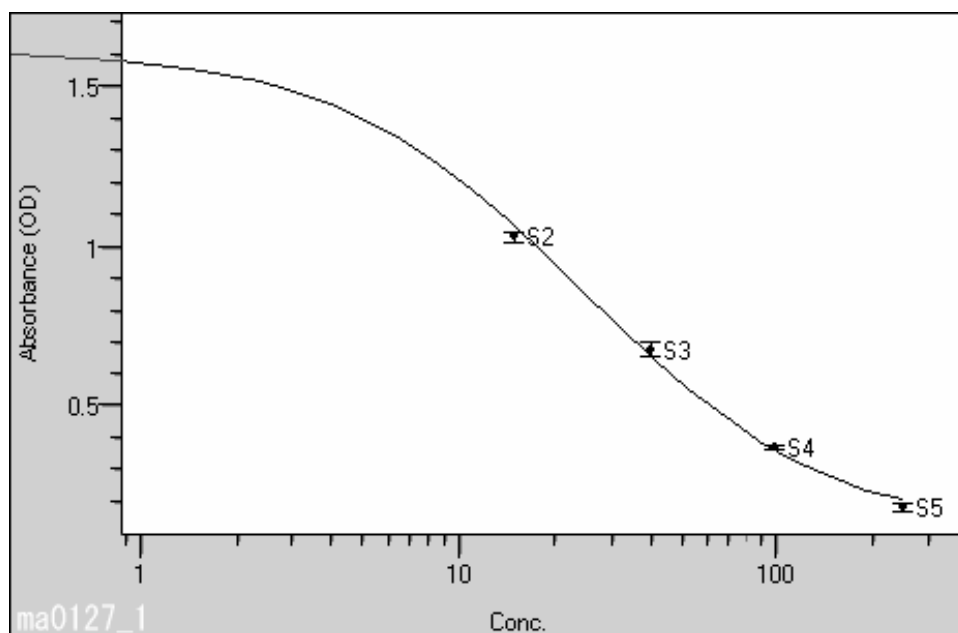


図 5.1.4.1 検量線 (1 日)

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	試験用試料溶液					
		ブランク	STD1 (S2)	STD2 (S3)	STD3 (S4)	STD4 (S5)	
所定濃度	μg/L	0	15	40	100	250	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	—	1.615	1.126	0.725	0.434	0.218
	2	—	1.549	1.037	0.739	0.419	0.202
	3	—	1.622	1.097	0.801	0.399	0.198

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	1.6	1.15	29.3	0.112	—

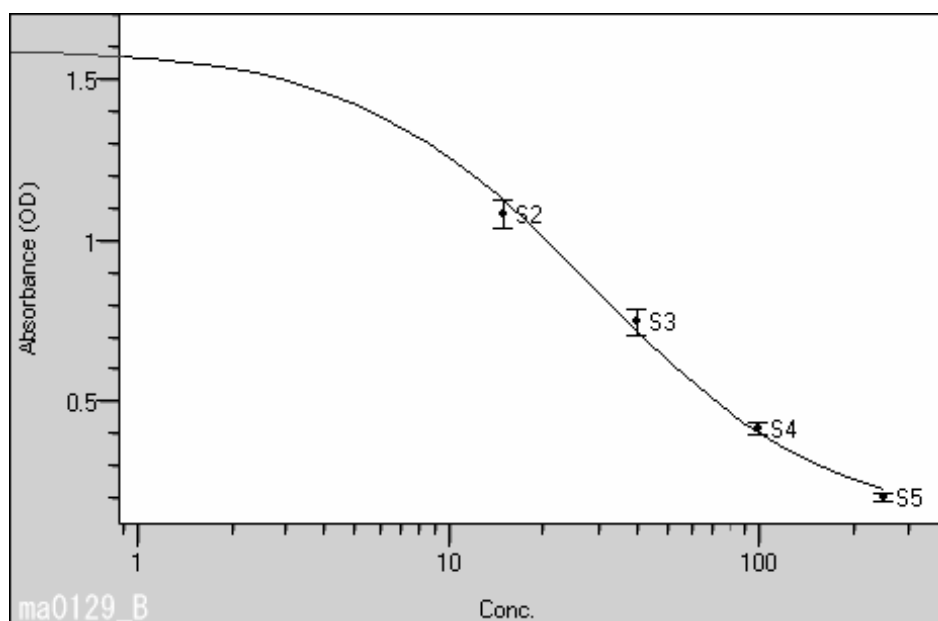


図 5.1.4.2 検量線 (2日)

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	試験用試料溶液					
		ブランク	STD1 (S2)	STD2 (S3)	STD3 (S4)	STD4 (S5)	
所定濃度	μg/L	0	15	40	100	250	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測* (吸光度)	1	—	1.586	1.003	0.612	0.322	0.175
	2	—	1.517	0.929	0.595	0.320	0.169
	3	—	1.456	0.921	0.576	0.308	0.161

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	1.53	1.18	21.9	0.107	—

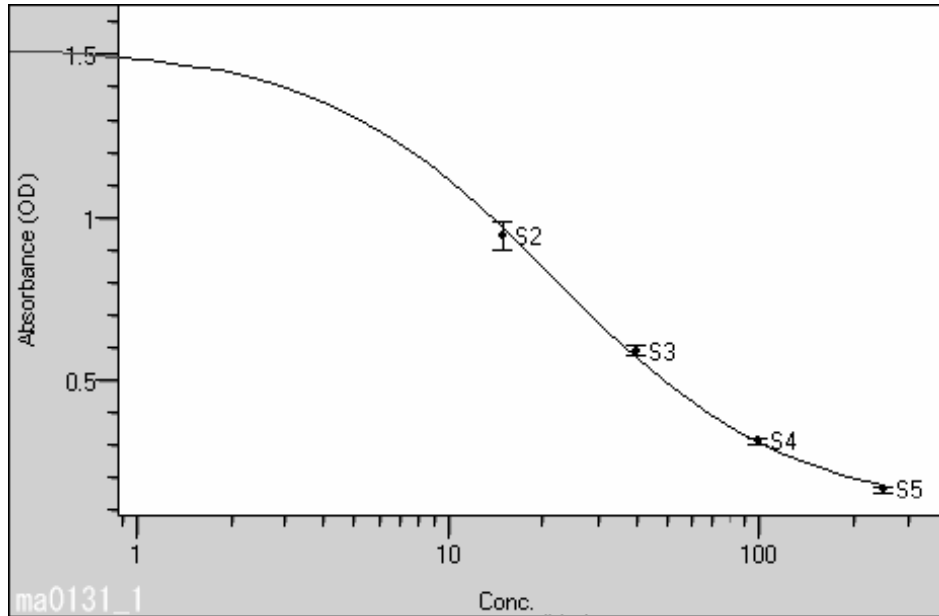


図 5.1.4.3 検量線 (3 日)

② 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	15	15	15	40	40	40	100	100	100	250	250	250	
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	1.548	1.511	1.411	1.102	1.062	0.903	0.668	0.705	0.572	0.343	0.388	0.306	0.174	0.187	0.149
		2	1.549	1.628	1.448	1.055	1.087	0.920	0.659	0.720	0.590	0.342	0.376	0.303	0.177	0.190	0.150
		3	1.500	1.537	1.412	1.031	1.062	0.934	0.661	0.690	0.563	0.355	0.381	0.308	0.179	0.192	0.147
	平均	—	1.532	1.559	1.424	1.063	1.070	0.919	0.663	0.705	0.575	0.347	0.382	0.306	0.177	0.190	0.149
換算値	μg/L	2.02	1.37	2.52	15.18	17.53	17.15	39.51	41.97	40.09	106.9	109.0	102.6	358.9	366.1	427.3	
標準偏差	μg/L	0.579			1.262			1.286			3.266			37.55			
変動係数	%	29.41			7.59			3.17			3.08			9.78			

(5) 期間再現性

① 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	試験用試料溶液					
		ブランク	STD1 (S2)	STD2 (S3)	STD3 (S4)	STD4 (S5)	
所定濃度	μg/L	0	15	40	100	250	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	—	1.666	1.054	0.710	0.378	0.202
	2	—	1.580	1.027	0.667	0.369	0.183
	3	—	1.576	1.025	0.668	0.374	0.180

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	1.62	1.14	24.5	0.109	—

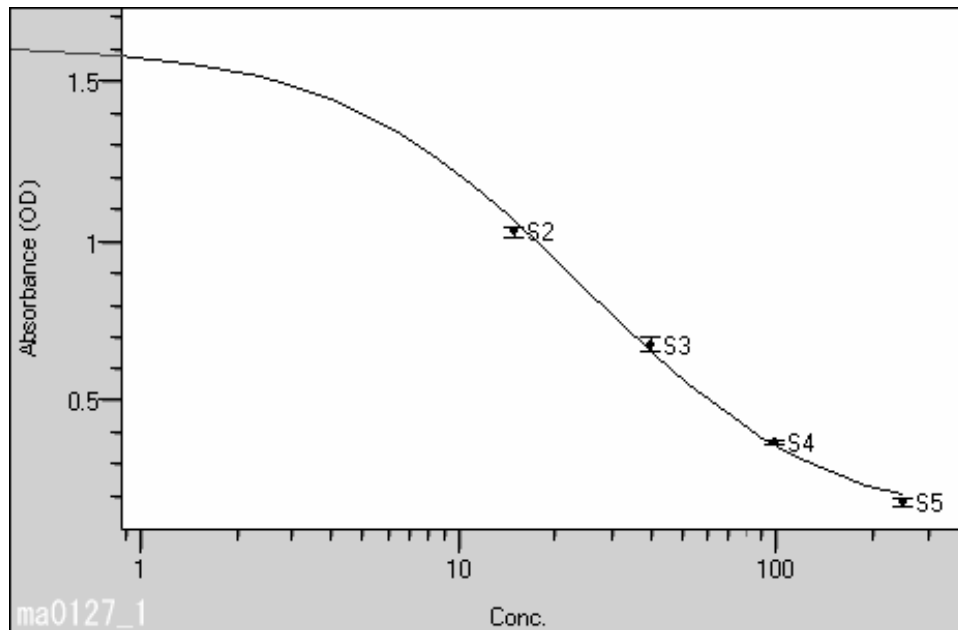


図 5.1.5.1 検量線

表 5.1.13.2 検量線用標準溶液の測定データ(1ヶ月)

項目	単位	試験用試料溶液					
		ブランク	STD1 (S2)	STD2 (S3)	STD3 (S4)	STD4 (S5)	
所定濃度	μg/L	0	15	40	100	250	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	—	1.553	0.955	0.613	0.313	0.164
	2	—	1.577	0.916	0.581	0.312	0.162
	3	—	1.517	0.942	0.566	0.301	0.155

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	1.56	1.15	20.8	0.0967	—

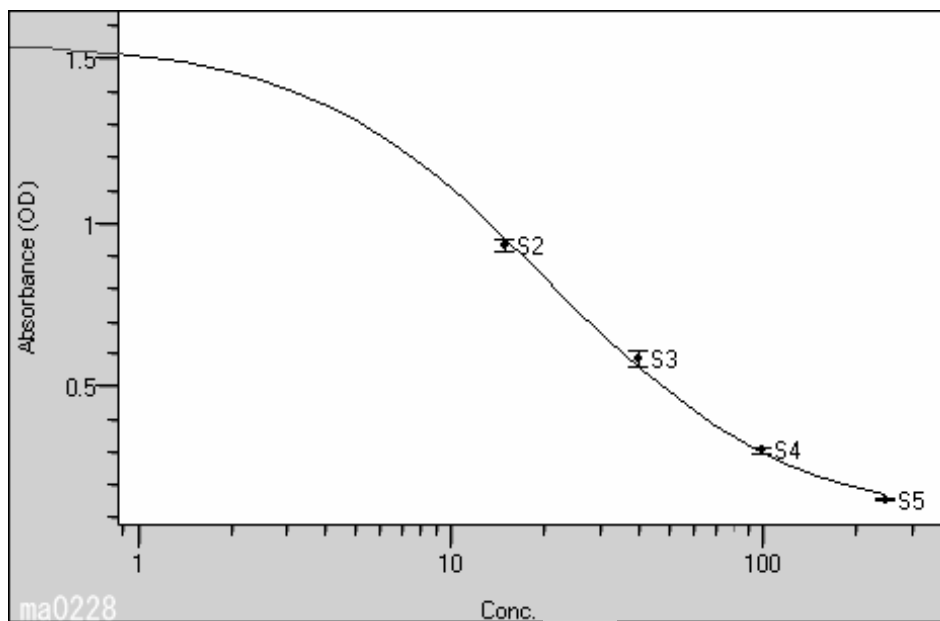


図 5.1.5.2 検量線

② 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	15	15	40	40	100	100	250	250		
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
ELISA 実測	吸光度	1	—	1.548	1.445	1.102	0.915	0.668	0.579	0.343	0.300	0.174	0.152
		2	—	1.549	1.402	1.055	0.909	0.659	0.550	0.342	0.311	0.177	0.156
		3	—	1.500	1.342	1.031	0.897	0.661	0.576	0.355	0.306	0.179	0.155
	平均	—	1.532	1.396	1.063	0.907	0.663	0.568	0.347	0.306	0.177	0.154	
換算値	μg/L	2.017	3.371	15.177	17.171	39.513	39.623	106.86	98.798	358.93	334.86		
標準偏差	μg/L	0.633	1.068	1.366	0.381	0.468	1.753	3.340	2.653	12.32	11.136		
変動係数	%	31.39	31.57	8.98	2.22	1.18	4.42	3.12	2.68	3.43	3.32		

(6) プレート間再現性

① 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	試験用試料溶液					
		ブランク	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)	
所定濃度	μg/L	0	15	40	100	250	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	—	1.466	1.097	0.691	0.357	0.181
	2	—	1.441	1.007	0.628	0.339	0.170
	3	—	1.480	0.973	0.625	0.338	0.164

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	1.47	1.27	28.1	0.106	—

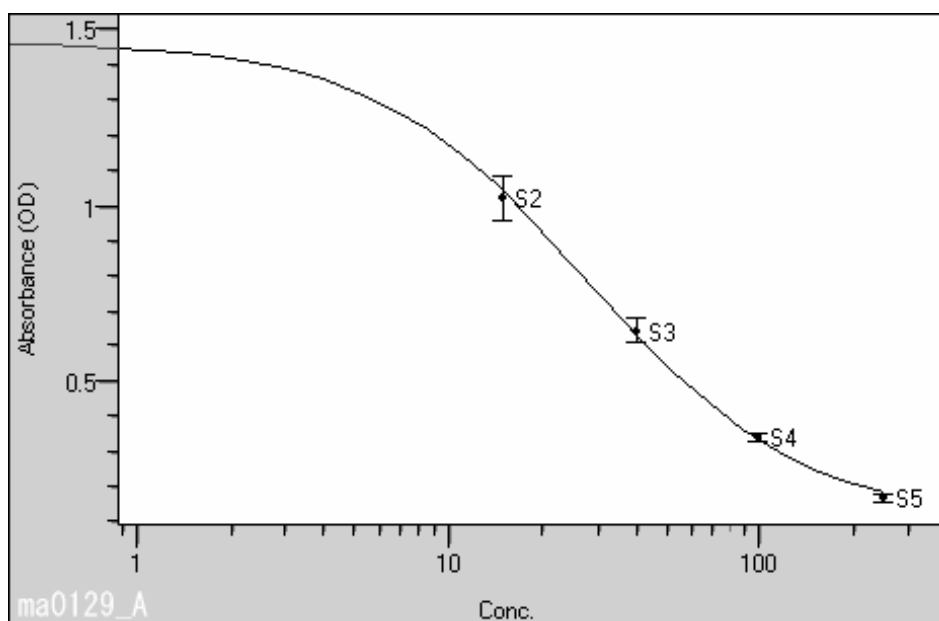


図 5.1.6.1 検量線 (プレート A)

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	試験用試料溶液					
		ブランク	STD1 (S2)	STD2 (S3)	STD3 (S4)	STD4 (S5)	
所定濃度	μg/L	0	15	40	100	250	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	—	1.615	1.126	0.725	0.434	0.218
	2	—	1.549	1.037	0.739	0.419	0.202
	3	—	1.622	1.097	0.801	0.399	0.198

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	1.6	1.15	29.3	0.112	—

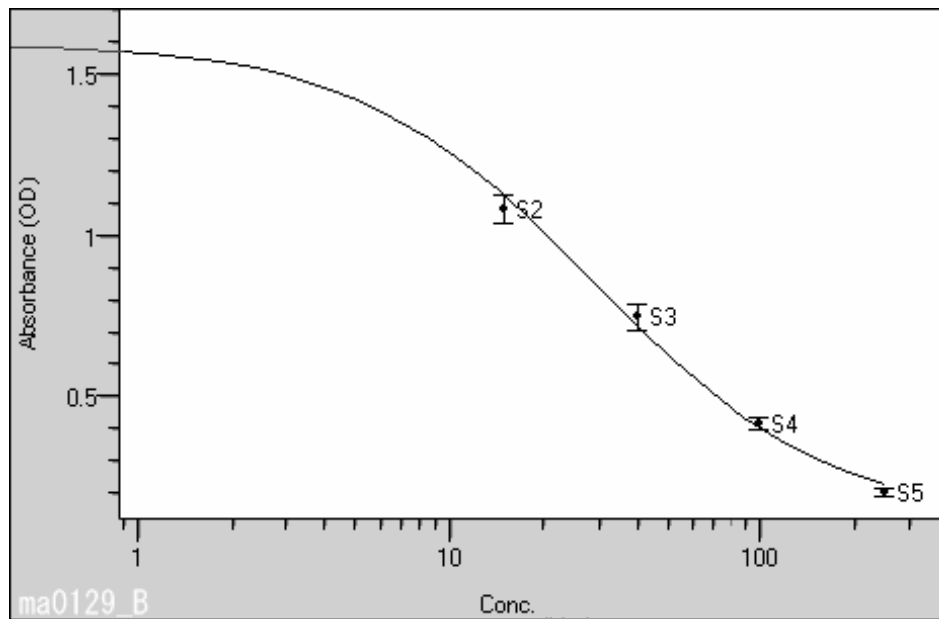


図 5.1.6.2 検量線 (プレート B)

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	試験用試料溶液					
		ブランク	STD1 (S2)	STD2 (S3)	STD3 (S4)	STD4 (S5)	
所定濃度	μg/L	0	15	40	100	250	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	—	1.270	0.943	0.584	0.339	0.173
	2	—	1.314	0.883	0.612	0.346	0.165
	3	—	1.301	0.906	0.605	0.338	0.173

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	1.3	1.2	29.3	0.103	—

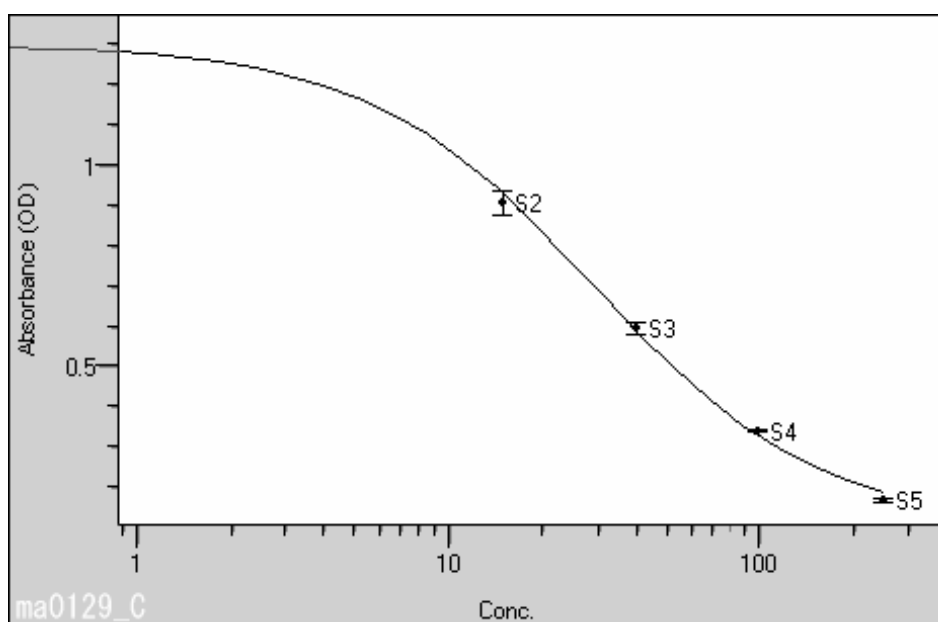


図 5.1.6.3 検量線 (プレート C)

② 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, B: 同一ロット、C: 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	15	15	15	40	40	40	100	100	100	250	250	250	
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	1.474	1.511	1.300	0.957	1.062	0.911	0.581	0.705	0.609	0.334	0.388	0.342	0.160	0.187	0.169
	2	1.483	1.628	1.280	0.946	1.087	0.889	0.611	0.720	0.590	0.315	0.376	0.338	0.163	0.190	0.163	
	3	1.520	1.537	1.248	0.964	1.062	0.899	0.592	0.690	0.597	0.330	0.381	0.342	0.164	0.192	0.162	
	平均	1.492	1.559	1.276	1.956	1.070	0.900	0.595	0.705	0.599	0.326	0.382	0.341	0.162	0.190	0.165	
換算値	μg/L	-	1.37	1.20	18.88	17.53	16.57	44.51	41.97	39.17	103.2	109.0	93.72	338.2	366.1	331.8	
標準偏差	μg/L	-			1.162			2.672			7.699			18.245			
変動係数	%	-			6.58			6.38			7.55			5.28			

(7) 交差反応性

①-1 検量線作成記録(フェニトロチオン試験用)

表 5.1.19.1 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液					
		ブランク	STD1 (S2)	STD2 (S3)	STD3 (S4)	STD4 (S5)	
所定濃度	μg/L	0	15	40	100	250	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	—	1.513	1.007	0.680	0.342	0.177
	2	—	1.510	0.988	0.638	0.338	0.176
	3	—	1.493	0.982	0.612	0.324	0.173

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	1.51	1.21	25.2	0.107	—

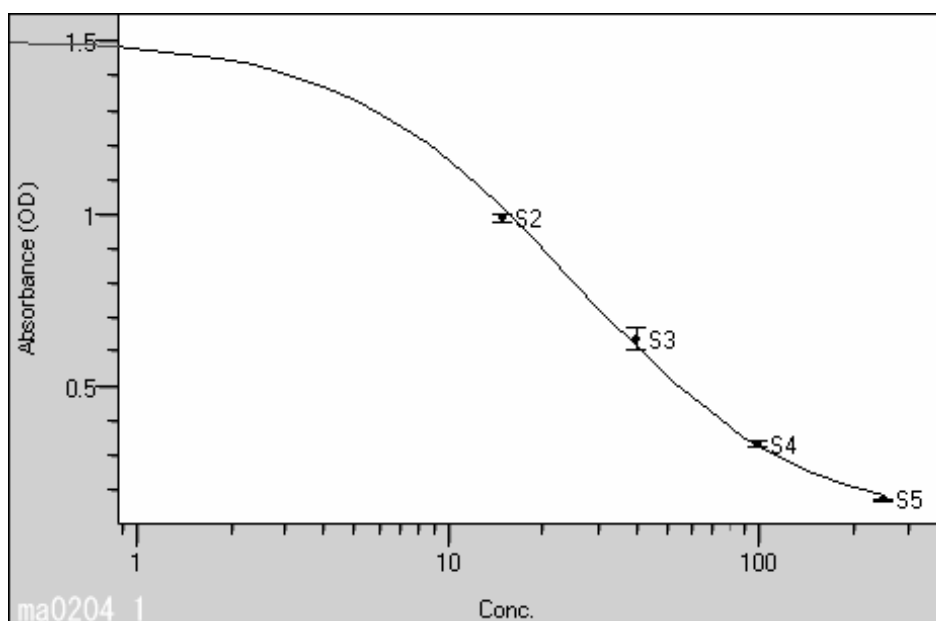


図 5.1.7 検量線

①-2 検量線作成記録(フェノブカルブ試験用)

表 5.1.19.2 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液					
		ブランク	STD1 (S2)	STD2 (S3)	STD3 (S4)	STD4 (S5)	
所定濃度	μg/L	0	15	40	100	250	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	—	1.538	0.999	0.641	0.379	0.187
	2	—	1.553	0.976	0.645	0.357	0.185
	3	—	1.472	0.953	0.617	0.328	0.166

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	1.53	1.13	23.9	0.106	—

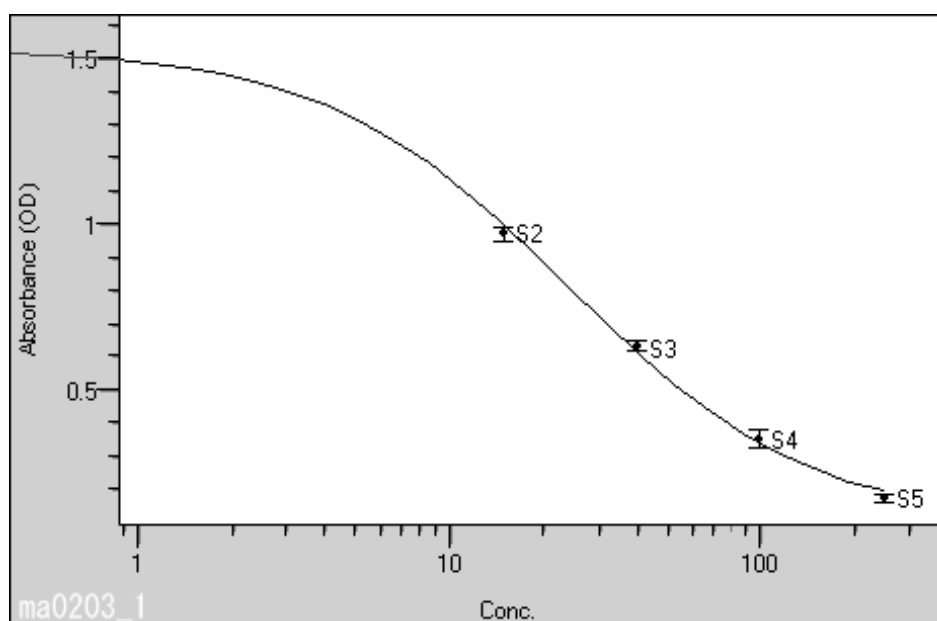


図 5.1.7.2 検量線

② 試験結果記録

②-1

表 5.1.21.1 マラチオン標準品の測定データ

項目	単位	試料溶液 (対象物質)						
		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	15	40	100	250	
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	0.034	1.499	1.012	0.634	0.345	0.174
	2	-	0.034	1.569	0.969	0.641	0.337	0.166
	3	-	0.034	1.499	1.009	0.633	0.347	0.177

表 5.1.21.2 交差反応性物質 (フェニトロチオン) の測定データ

項目	単位	試料溶液 (類似物質)						
		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	1.5	4	10	25	
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	0.034	1.488	1.024	0.767	0.415	0.226
	2	-	0.034	1.431	1.049	0.740	0.432	0.228
	3	-	0.034	1.387	1.010	0.715	0.432	0.235

マラチオン標準品の吸光度曲線：

$$\text{吸光度} = (1.53 - 0.103) / (1 + (X/24.7)^{1.18}) + 0.103 \quad \dots \dots \dots \text{①}$$

$$\text{①より、} X=0 \text{ のとき吸光度} = 1.53 \text{ (吸光度の最大値)} \quad \dots \dots \dots \text{②}$$

$$\text{プレートブランク} = 0.034 \text{ (吸光度の最小値)} \quad \dots \dots \dots \text{③}$$

②、③より、

$$\text{マラチオンの 50\% 発色阻害の吸光度} = 0.782 \text{ のとき、①より } X = 26.811 \text{ (}\mu\text{g/L)} \quad \dots \dots \text{④}$$

フェニトロチオンの吸光度曲線：

$$\text{吸光度} = (1.44 - 0.143) / (1 + (X/3.26)^{1.18}) + 0.143 \quad \dots \dots \dots \text{⑤}$$

$$\text{⑤より、} X=0 \text{ のとき吸光度は } 1.44 \text{ (吸光度の最大値)} \quad \dots \dots \dots \text{⑥}$$

⑥、③より、フェニトロチオンの 50% 発色阻害の吸光度 = 0.737 のとき、

$$\text{⑤より、} X = 3.760 \text{ (ng/L)} \quad \dots \dots \dots \text{⑦}$$

$$\text{④と⑦より、交差率は、} (26.811/3760) * 100 = 0.713 \text{ (\%)} \quad \dots \dots \dots$$

②-2

表 5.1.22.1 マラチオン標準品の測定データ

項目	単位	試料溶液 (対象物質)						
		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	15	40	100	250	
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	0.034	1.435	0.948	0.603	0.312	0.162
	2	-	0.034	1.485	0.965	0.626	0.321	0.159
	3	-	0.034	1.513	1.036	0.621	0.337	0.167

表 5.1.22.2 交差反応性物質 (フェノブカルブ) の測定データ

項目	単位	試料溶液 (類似物質)						
		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	4	10	25	60	
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	0.034	1.474	1.432	1.494	1.356	1.300
	2	-	0.034	1.403	1.455	1.428	1.374	1.318
	3	-	0.034	1.359	1.425	1.424	1.425	1.377

マラチオン標準品の吸光度曲線：

$$\text{吸光度} = (1.48 - 0.0988) / (1 + (X/25.2)^{1.22}) + 0.0988 \quad \dots \text{①}$$

$$\text{①より、X=0 のとき吸光度} = 1.48 \text{ (吸光度の最大値)} \quad \dots \text{②}$$

$$\text{プレートブランク} = 0.034 \text{ (吸光度の最小値)} \quad \dots \text{③}$$

フェノブカルブは、今回設定した濃度範囲では発色の阻害が弱く、吸光度曲線は求められなかった。

$$\text{濃度 60mg/L のとき吸光度} = 1.3317 \text{ (ブランクを差し引くと 1.298)} \quad \dots \text{④}$$

④の場合、マラチオンの式①の最大吸光度②をフェノブカルブでも最大とみなすと、発色の阻害率は、10.26%。

$$\text{マラチオンの式①において吸光度が④と同じになるのは、X=4.441 } \mu\text{g/L のとき} \quad \dots \text{⑤}$$

④と⑤より、

$$\text{交差率} = (4.441/60000) * 100 = 0.0074$$

交差率は 0.1% 未満

5.2 実用的な性能

(1) 回収特性

① 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	試験用試料溶液					
		ブランク	STD1 (S2)	STD2 (S3)	STD3 (S4)	STD4 (S5)	
所定濃度	μg/L	0	15	40	100	250	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	—	1.619	1.125	0.708	0.386	0.199
	2	—	1.549	1.083	0.713	0.392	0.193
	3	—	1.549	1.083	0.732	0.393	0.197

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	1.58	1.23	28.6	0.119	—

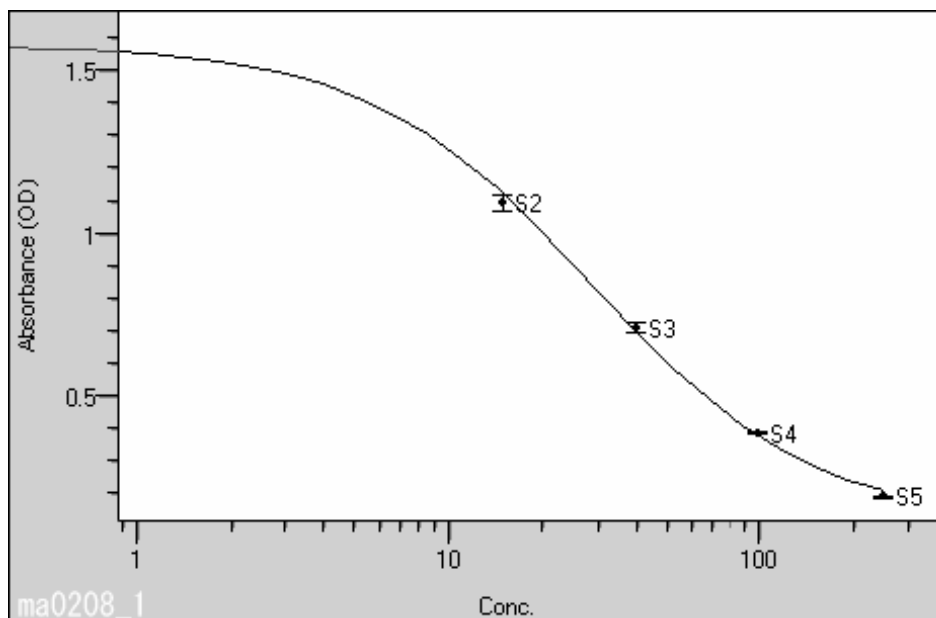


図 5.2.1 検量線

② 試験結果

河川水に測定範囲の中央付近（最終濃度：60 $\mu\text{g/L}$ ）のマラチオンを添加し、さらにフミン酸ナトリウムを添加（最終濃度：0, 1, 5, 10, 50 mg/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						
		60 $\mu\text{g/L}$ 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	—	0.545	0.563	0.501	0.475	0.287
		2	—	0.555	0.549	0.501	0.468	0.283
		3	—	0.543	0.551	0.512	0.486	0.295
	平均	—	0.548	0.554	0.505	0.476	0.288	
換算値	$\mu\text{g/L}$	58.61	57.57	66.05	71.80	150.14		
回収率	%	97.68	95.94	110.08	119.67	250.23		

- (2) 測定精度等
- (2)-1 実試料分析
- ① 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	試験用試料溶液					
		ブランク	STD1 (S2)	STD2 (S3)	STD3 (S4)	STD4 (S5)	
所定濃度	μg/L	0	15	40	100	250	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	—	1.589	0.993	0.617	0.319	0.158
	2	—	1.430	0.949	0.603	0.308	0.150
	3	—	1.428	0.928	0.588	0.308	0.156

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	1.49	1.2	24.1	0.0895	—

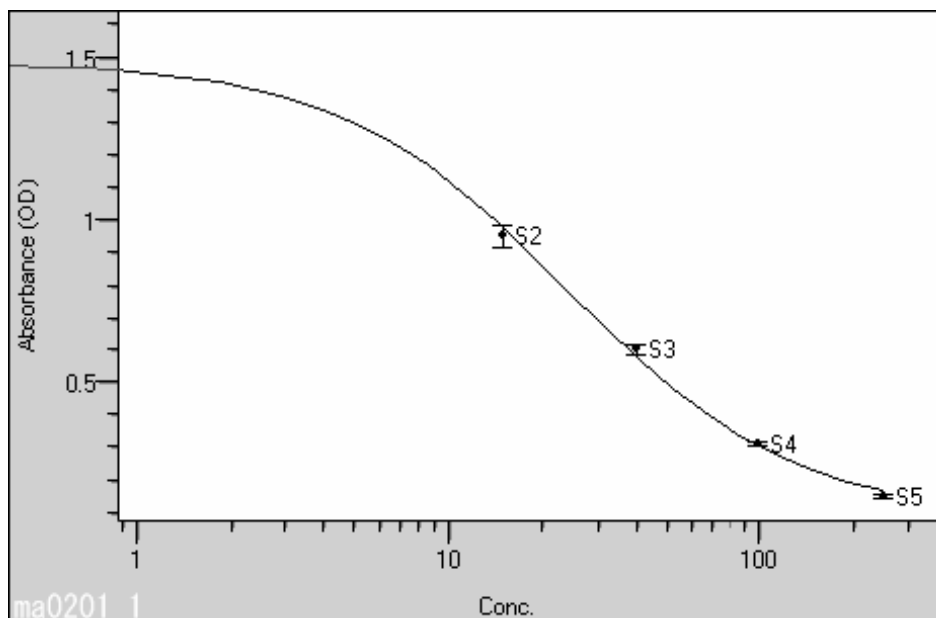


図 5.2.2 検量線

② 試験結果記録

結果は表 5.2.6 のとおりである。実試料のマラチオンは ELISA 法及び機器分析とも定量下限未満であったが、ELISA 法では検出下限以上のものがあった。

表 5.2.6 実試料測定結果

試料番号	ELISA 法				測定結果 ($\mu\text{g}/1$)	機器分析		
	吸光度					測定結果 ($\mu\text{g}/1$)	n	標準 偏差
	1 回目	2 回目	3 回目	平 均				
S1-1	1.359	1.302	1.307	1.323	ND (4.5)	ND	3	—
S1-2	1.357	1.341	1.398	1.365	ND (3.4)			
S1-3	1.435	1.378	1.391	1.401	ND (2.5)			
S2-1	1.380	1.326	1.384	1.363	ND (3.4)	ND	3	—
S2-2	1.269	1.333	1.308	1.303	ND (5.0)			
S2-3	1.245	1.295	1.235	1.258	ND (6.1)			
S3-1	1.233	1.286	1.293	1.271	ND (5.8)	ND	3	—
S3-2	1.263	1.261	1.264	1.263	ND (6.0)			
S3-3	1.271	1.281	1.317	1.290	ND (5.3)			
検出下限					3.8	0.004	—	—
定量下限					12.8	0.01	—	—

(注) ELISA 法の測定結果の欄の () 内に計算値を示し、定量下限値より小さいため ND とした。

(2)-2 実試料添加試験

① 検量線作成記録

表 5.2.7 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液					
		ブランク	STD1 (S2)	STD2 (S3)	STD3 (S4)	STD4 (S5)	
所定濃度	μg/L	0	15	40	100	250	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	—	1.679	1.599	1.092	0.678	0.382
	2	—	1.473	1.431	1.014	0.659	0.372
	3	—	1.516	1.470	1.029	0.661	0.381

表 5.2.8 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	1.51	1.22	27.4	0.128	—

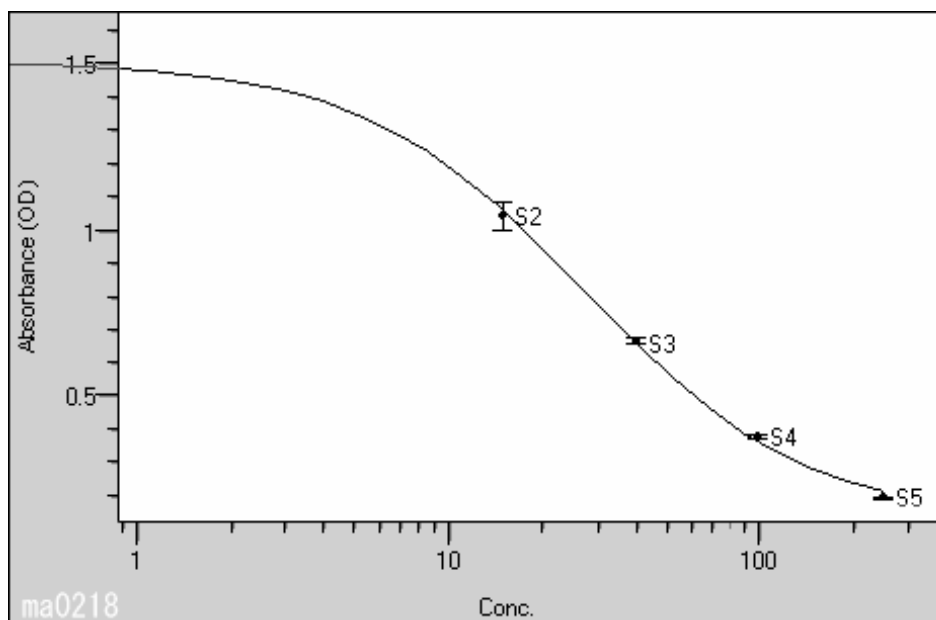


図 5.2.3 検量線

② 試験結果記録

結果は表 5.2.9 のとおりである。河川水に公共用水域における農薬の水質評価指針値 $10 \mu\text{g/L}$ 及びその前後の $1 \mu\text{g/L}$ 、 $5 \mu\text{g/L}$ 、 $20 \mu\text{g/L}$ 相当のマラチオンを添加して ELISA 法で測定したところ、河川水添加濃度が $1 \mu\text{g/L}$ の低濃度の場合は実際よりかなり高値を示すが、水質評価指針値付近の濃度はほぼ添加濃度と合致しており、水質評価指針のチェックには使用可能であることがわかった。

表 5.2.9 試料溶液の測定データ

項目		単位	河川水にマラチオン標準品添加					
河川水添加濃度		$\mu\text{g/L}$	0	1	5	10	20	
測定時濃度		$\mu\text{g/L}$	0	0.9	4.5	9	18	
実測回数		回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測	吸光度	1	—	1.442	1.384	1.255	1.110	0.904
		2	—	1.448	1.389	1.331	1.089	0.898
		3	—	1.407	1.384	1.278	1.133	0.899
	平均	—	1.432	1.386	1.288	1.111	0.900	
換算値		$\mu\text{g/L}$	2.665	4.071	7.030	13.055	22.494	
回収率		%	—	452	156	145	124	

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15~100 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

環境試料として河川水にマラチオンを添加した実証試験の結果から、20 μ g/L以上の濃度であれば、水質モニタリング等の実用化が可能である。

(3) 製品操作等の簡便性

一般環境モニタリングでの使用を想定した場合、試料の前処理がない場合、約3時間で測定結果が得られた。同時に約25試料(3重測定)の測定が可能である。

なお、本試験での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	株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー
技術・製品の名称	《技術名》ELISA法（酵素免疫測定法） 《製品名》マラチオン測定キット

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 惠宣

（環境技術開発者）

株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー

代表取締役社長 河野 猛

目 次

1 . 実証試験の概要と目的	1
1.1 実証試験の概要と目的	1
1.2 実証試験の視点	1
2 . 実証試験の参加組織と実証試験参加者の責任分掌	2
2.1 実証試験の参加組織	2
2.2 実施体制	2
2.3 実証試験参加者の責任分掌	3
3 . 実証試験の対象とする化学物質簡易モニタリング技術の概要	4
3.1 実証対象技術の原理	4
3.2 実証対象製品のデータ	4
4 . 実証試験のデザイン	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（キットの概要等）

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	株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー
	住所	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。

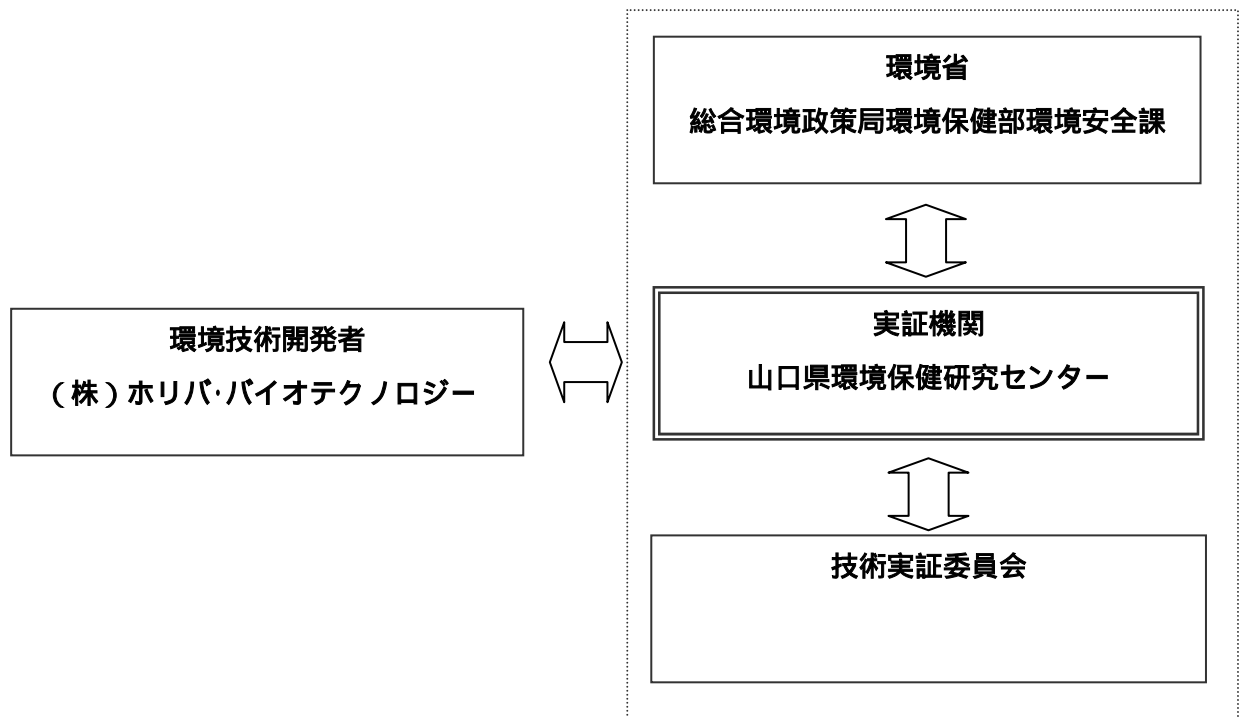


図 2.2 実証試験の実施体制

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	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	実証対象製品全体の総括責任者	開発製造部 部長	伊東 茂壽
	実証対象製品の提供	開発製造部 副部長	門脇 篤
	実証対象製品の取扱説明書等の提供	開発製造部 副部長	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、マラチオンに対する特異的な抗体を応用した、環境水、農産物中のマラチオン測定 ELISA キットである。

ELISA の原理は、競合反応（マラチオン濃度が高い試料では吸光度が低く、マラチオン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	マラチオン測定キット
型番	EL206-00
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）	350 g
価格（円）	99,750 円
分析対象物質	マラチオン
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（調整済 <u>調整要</u> ）
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 8 ヶ月間
同時測定数（最多）	46 試料
測定時間	2～3 時間

表 3.2 実証対象製品のデータ (2)

項目	記入欄
1. 基本的な性能	
測定範囲	15 ~ 250ppb
検出下限及び定量下限	
繰返し再現性	標準偏差 : 4.13 ~ 13.93 変動係数 : 6.3 ~ 9.4%
日間再現性	標準偏差 : 3.22 ~ 11.90 変動係数 : 4.3 ~ 13.4%
期間再現性	保存安定性
プレート間再現性	
交差反応性	交差率 : 0.9% (フェニトロチオン)
	交差率 : 0.4% (チオメトン)
その他	
2. 実用的な性能	
回収特性	回収率 : 109.8 ~ 136.1%
測定精度等	
その他	
試験責任者	伊東 茂壽
試験年月日	平成 年 月 日

4. 実証試験のデザイン

4.1 実証試験の期間

実証試験の期間は、平成 17 年 1 月中旬～平成 17 年 2 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		2月	3月	
	29日	1週	2週	3週	4週	5週	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								
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（マラチオン）」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 680XR）で測定し、指定濃度系列及び各試験用試料溶液の吸光度とする。

エ．検量線の作成

プレート毎に同時に測定したゼロブランク（BLK：添付の希釈液等）及び標準溶液指定濃度系列の吸光度（3重測定の平均値）から、4-parameter logistic fitting 後、検量線を作成する。（検量線作成用の解析ソフト：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

馬拉チオンの市販標準物質（和光純薬工業）を用いて、10%メタノールを希釈溶媒として、試験用試料溶液を調製する。

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

表 4.4.1 標準溶液指定系列及び試験用試料溶液

試験項目	物質名	試料溶液調製濃度
標準溶液指定濃度系列	馬拉チオン	0, 15, 40, 100, 250 µg/L
測定範囲 日間再現性 期間再現性 プレート間再現性	馬拉チオン	0, 15, 40, 100, 250 µg/L
検出下限及び定量下限	馬拉チオン	15 µg/L
繰返し再現性	馬拉チオン	60 µg/L
交差反応性	フェニトロチオン フェノブカルブ	0, 1.5, 4, 10, 25 mg/L 0, 4, 10, 25, 60 mg/L

測定範囲試験

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

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

検出下限及び定量下限試験

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

繰返し再現性試験

測定範囲の直線域に調製した試料溶液を3重測定で8回測定し、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（製造年月日と同じ）の2枚のプレートを用いて、1ヶ月以上離れた時期に「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

マラチオン及び類似物質（フェニトロチオン、フェノブカルブ）について調製した試料溶液で吸光度曲線（実測値は3重測定の平均値から求める）を描き、吸光度曲線から類似物質の50%発色阻害濃度を求める。 $(\text{マラチオンの50\%阻害濃度} / \text{類似物質の50\%阻害濃度}) \times 100 (\%)$ で交差率を求め、類似物質の交差反応性を検討する。

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

(2) 実用的な性能試験

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

回収特性試験

グラスファイバーフィルター（GFC：孔径 1.2 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（マラチオン）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：マラチオン	60 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。

特開2000-236875「マラチオンのハプテン化合物、抗体および測定方法」

2. その他

環境モニタリングへの適用性、将来の発展性、今後の取組等を記入して下さい。

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、マラチオンは「PRTR法対象物質」、「内分泌攪乱作用が疑われる化学物質」、「公共用水等における農薬の水質評価指針(指針値0.01mg/L以下)」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。

スマートアッセイ シリーズ (環境測定用)

マラチオン測定キット

1. はじめに

本品は、マラチオン* (農薬商品名: マラソン) 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) によるマラチオンの測定キットです。マラ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。

* 登録業者: 八洲化学, 日本農業, 三共, 北興化学, 日産化学, フマキラー, サンケイ化学, キング化学, トモアグリカ, 武田薬品, クミアイ化学, 第一農業, 琉球産経, 北興産業, 住友化学, ヤシマ産業

2. 測定原理

本キットは、環境水等中のマラチオンを ELISA で測定するものです。すなわち、マラ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マラチオン) と標識抗原 (マラチオン酵素標識物) 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マラチオン量に反比例します。標準試液のマラチオン濃度に対し、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マラチオン濃度を求めます。

3. 測定キットの特徴

- 1) **高感度**— マラチオンを 15~250 ppb の範囲で測定できます。
- 2) **簡便**— 機器分析法に比べ試料の煩雑な前処理を必要とせず、簡易な操作で測定できます。
- 3) **迅速**— 前処理が簡単なため、短時間で多くの試料を同時に測定できます。
- 4) **低コスト**— 高価な機器を必要とせず、測定場所を特に選ばないため、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
①	マラチオン抗体プレート	8ウエル×12列 (96ウエル)	乾燥品	1枚
②	マラチオン標準試薬 (250 ppm)	1.5 mL	液状品	4バイアル
③	マラチオン酵素標識物試薬	6 mL	凍結乾燥品	2バイアル
④	洗浄試薬(10倍濃縮)	50 mL	液状品	1バイアル
⑤	発色試薬	13 mL	液状品	1バイアル
⑥	発色停止試薬	13 mL	液状品	1バイアル
⑦	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

- ① マラチオン測定キット: ホリバ・バイオテクノロジー社製
- ② 精製水
- ③ メタノール: 環境分析用
- ④ 10%メタノール: 精製水を用いて10倍希釈

(2) 器具

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

(3) 装置

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

6. 試液の調製

1) 試液調製上の留意事項

- (1) 試薬は、使用前に冷蔵庫から出し、室温に戻してから使用して下さい。
- (2) 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。
- (3) 製造番号の異なるキットの構成試薬を組み合わせず使用しないで下さい。
- (4) マラチオン標準試液は必ず使用時に調製して下さい。
- (5) マラ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

- ① マラチオン抗体プレート
そのまま用います。
- ② マラチオン標準試液
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
マラチオン標準試薬 (250 ppm) をメタノールで 100 倍希釈し、100 倍希釈液 (2.5 ppm) を調製します。
 - b) ステップ-2
100 倍希釈液 (2.5 ppm) を精製水で 10 倍希釈し、10 倍希釈液 (250 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 (250 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マラチオン標準試液を調製します。参考として 25 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)	250	100	40	15	0
10 倍希釈液 (mL)	*	10	4	1.5	*
10%メタノール (mL)	*	15	21	23.5	*

- ③ マラ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、マラチオン酵素標識物試液とします。
- ④ 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。
- ⑤ 発色試薬
そのまま用います。
- ⑥ 発色停止試薬
そのまま用います。

7. 測定操作

1) 測定操作上の留意事項

- ① 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。
- ② 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。
- ③ 反応中は、マイクロプレートを静置して下さい。
- ④ 分注する際は、泡が入らないように注意して下さい。
- ⑤ 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。
- ⑥ プレート裏面には触れないように注意して下さい。
- ⑦ 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

マラ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、それぞれにマラ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

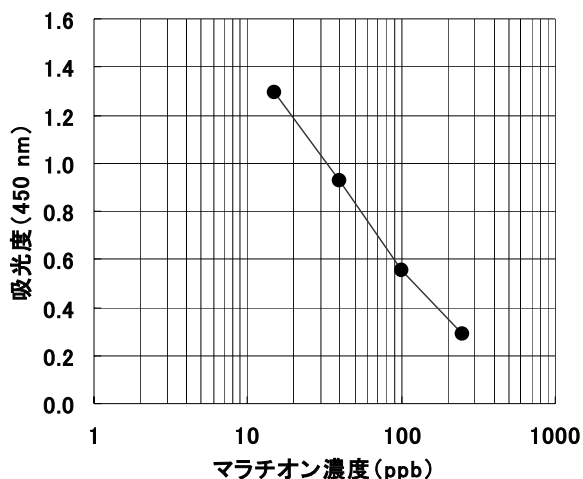
マイクロピペット (50~200 μ L 用) で発色試薬 100 μ L を加えて室温 (15~25 $^{\circ}$ C) で 10 分間反応させた後、発色停止試薬 100 μ L をマイクロピペット (50~200 μ L 用) で添加して下さい。
* 各ウェルの発色反応時間が一定になるように注意して下さい。
* 発色試薬を加えると時間と共に青色に、発色停止試薬を加えると瞬時に黄色に呈色します。

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。
マラ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) 試料中のマラチオン濃度の計算

マラ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マラチオン濃度 (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、試料中のマラチオン濃度 (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 (15 ~ 250 ppb) で行って下さい。250 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、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。



第1図 検量線例

- て下さい。
- ⑦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。
 - ⑧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。
 - ⑨食品衛生・環境等に関わる自主検査用です。
 - ⑩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。

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>

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(%)
馬拉松	馬拉松	100
フェントロチオン	スミチオン	0.9
チオメシ	エカチ	0.4
ジメエート	ジメエート	<0.1
アセフェート	オルラン	<0.1
フェンブカルブ	バッサ	<0.1
フェンバレート	スミサイジン	<0.1
ベルメリントランシス		<0.1
ベルメリン	アディオ	<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 8 箇月です。

10. 注意事項

- ①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。
- ②責任ある管理者の指導のもとに、保護手袋、保護メガネ等を着用して安全に取り扱って下さい。
- ③試薬類は冷蔵庫(2~8℃)で保存して下さい。
- ④馬拉松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。
- ⑤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。
- ⑥身体に異常を感じた場合は、直ちに医師の手当てを受け