

(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 5.1.20 検量線用標準溶液の測定データ(0ヶ月)

項目	単位						
		ブランク	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)	
所定濃度	µg/L	0	2	8	40	100	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測* (吸光度)	1	-	2.145	1.774	1.325	0.547	0.260
	2	-	2.243	1.799	1.238	0.543	0.272
	3	-	2.179	1.781	1.217	0.531	0.269

表 5.1.21 採用した回帰式係数[Y =D+(A-D)/(1+(X/C)^B)]の場合(0ヶ月)

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	2.18	1.04	9.37	0.138	

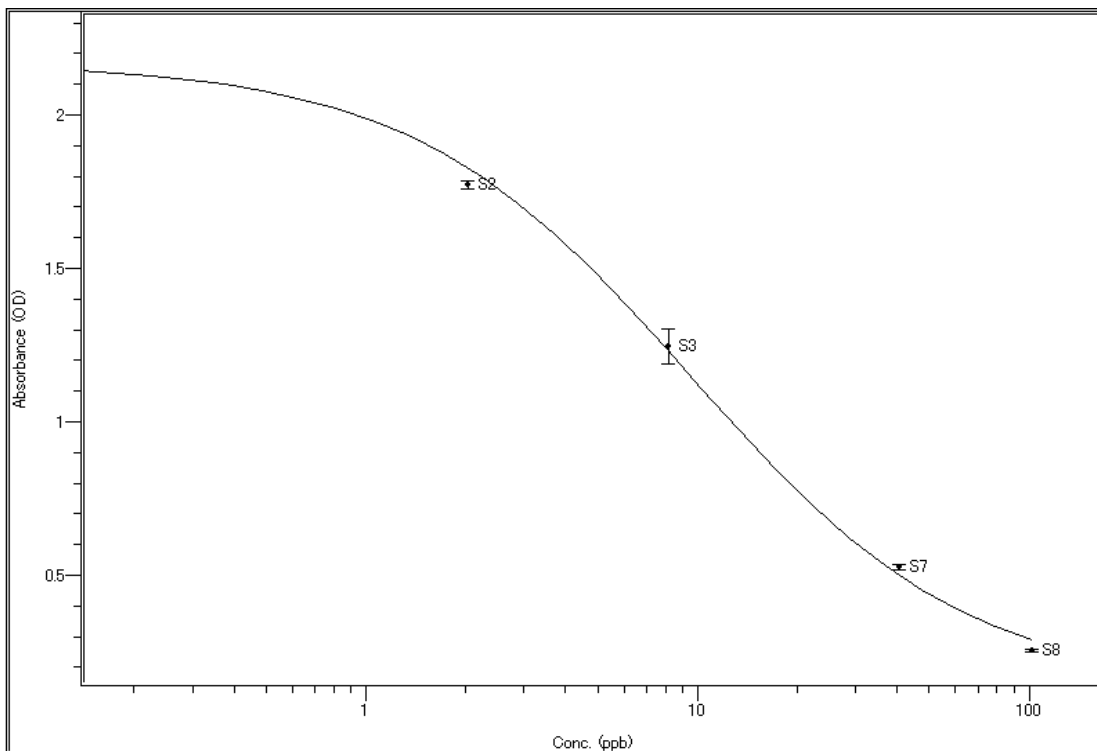


図 5.1.8 検量線(0ヶ月)

表 5.1.22 検量線用標準溶液の測定データ(1ヶ月)

項目	単位						
		ブランク	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)	
所定濃度	μg/L	0	2	8	40	100	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測* (吸光度)	1	-	2.245	1.864	1.384	0.620	0.308
	2	-	2.232	1.834	1.359	0.614	0.301
	3	-	2.246	1.791	1.335	0.621	0.294

表 5.1.23 採用した回帰式係数 $[Y = D + (A - D) / (1 + (X/C)^B)]$ の場合(1ヶ月)

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	2.23	1.01	10.7	0.145	

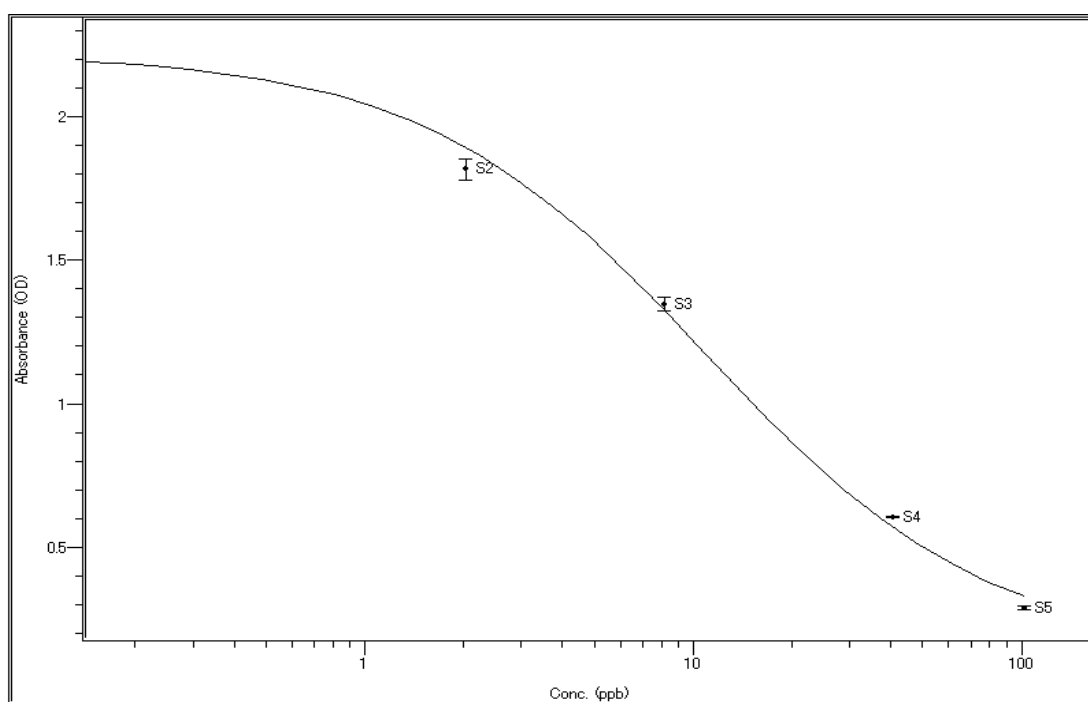


図 5.1.9 検量線(1ヶ月)

試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.24 対象物質試料溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液											
		溶液 S1		溶液 S2		溶液 S3		溶液 S4		溶液 S5			
		0	1ヶ月	0	1ヶ月	0	1ヶ月	0	1ヶ月	0	1ヶ月		
調製濃度	µg/L	0	0	2	2	8	8	40	40	100	100		
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
ELISA 実測	吸光度	1	-	2.155	2.181	1.820	1.893	1.277	1.320	0.553	0.588	0.263	0.301
		2	-	2.172	2.236	1.848	1.887	1.308	1.366	0.545	0.611	0.265	0.316
		3	-	2.397	2.226	1.852	1.901	1.339	1.401	0.531	0.614	0.260	0.314
	平均	-	2.241	2.215	1.840	1.894	1.308	1.363	0.543	0.605	0.263	0.311	
換算値	µg/L	-	-	1.994	2.078	7.085	7.631	36.19	37.26	131.7	120.8		
標準偏差	µg/L	-	-	0.118	0.051	0.424	0.608	1.207	1.490	2.753	6.560		
変動係数	%	-	-	5.9	2.5	6.0	8.0	3.3	4.0	2.1	5.4		

*実測は3重測定以上とする

(6) プレート間再現性

検量線作成記録

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 5.1.25 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	2	8	40	100	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測* (吸光度)	1	-	2.234	1.820	1.380	0.597	0.297
	2	-	2.269	1.860	1.382	0.586	0.297
	3	-	2.257	1.808	1.346	0.577	0.289

表 5.1.26 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	2.24	1.07	10.5	0.157	

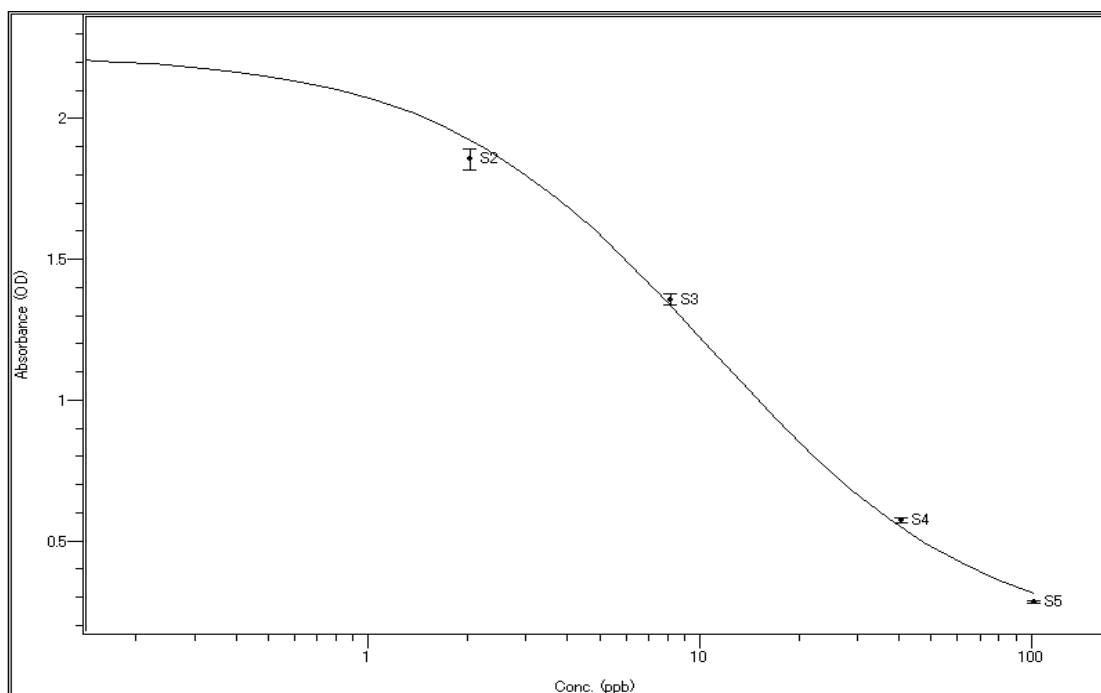


図 5.1.10 検量線(プレートA)

表 5.1.27 検量線用標準溶液の測定データ(プレートB)

項目	単位						
		ブランク	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)	
所定濃度	μg/L	0	2	8	40	100	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測* (吸光度)	1	-	2.346	1.982	1.529	0.711	0.366
	2	-	2.292	1.869	1.467	0.679	0.345
	3	-	2.242	1.832	1.381	0.641	0.318

表 5.1.28 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	2.27	1.03	11.8	0.177	

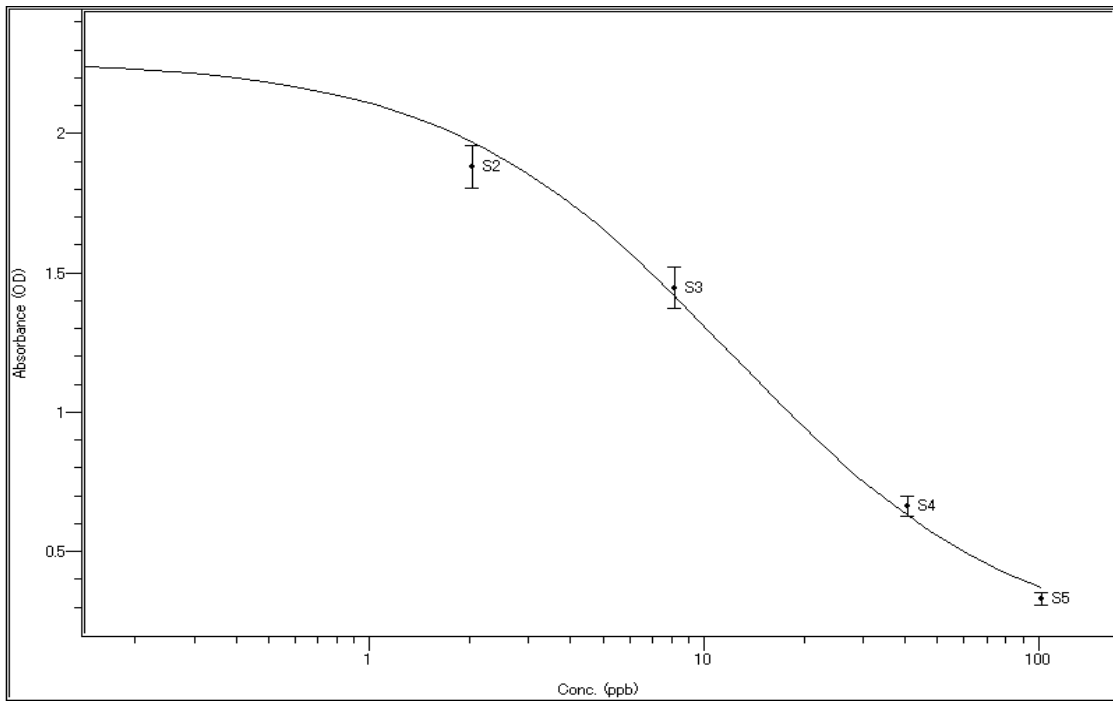


図 5.1.11 検量線(プレートB)

表 5.1.29 検量線用標準溶液の測定データ(プレートC)

項目	単位						
		ブランク	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)	
所定濃度	μg/L	0	2	8	40	100	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測* (吸光度)	1	-	2.185	1.725	1.193	0.547	0.267
	2	-	2.235	1.795	1.255	0.547	0.266
	3	-	2.247	1.760	1.212	0.547	0.265

表 5.1.30 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	2.22	0.974	8.48	0.131	

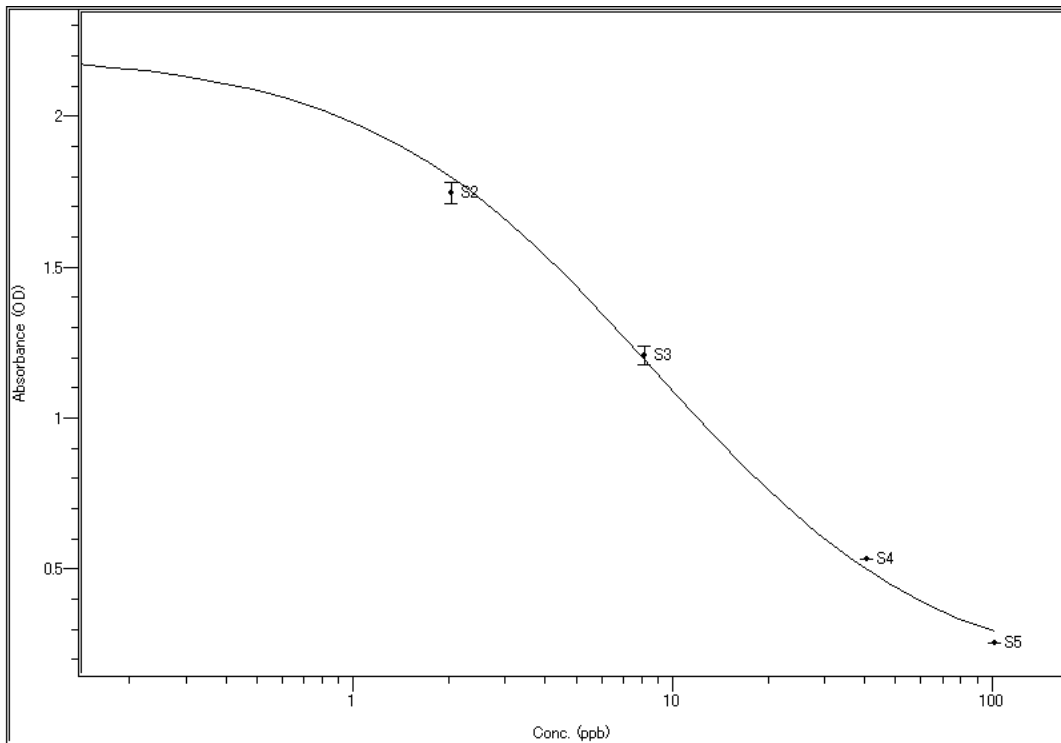


図 5.1.12 検量線(プレートC)

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 5.1.31 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- トA	プレ- トB	プレ- トC	プレ- トA	プレ- トB	プレ- トC	プレ- トA	プレ- トB	プレ- トC	プレ- トA	プレ- トB	プレ- トC	プレ- トA	プレ- トB	プレ- トC		
調製濃度	µg/L	0	0	0	2	2	2	8	8	8	40	40	40	100	100	100		
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	-	2.274	2.341	2.138	1.928	1.887	1.813	1.332	1.416	1.276	0.570	0.637	0.484	0.300	0.328	0.268
	2	-	2.259	2.326	2.189	1.956	1.923	1.818	1.358	1.421	1.301	0.575	0.609	0.520	0.290	0.325	0.259	
	3	-	2.288	2.315	2.192	1.922	1.904	1.823	1.320	1.470	1.289	0.595	0.621	0.508	0.283	0.322	0.273	
	平均	-	2.274	2.327	2.173	1.935	1.905	1.818	1.337	1.436	1.289	0.580	0.622	0.504	0.291	0.325	0.267	
換算値	µg/L	-	-	0.185	2.008	2.636	1.953	8.164	7.936	6.799	37.64	41.94	40.81	128.0	143.3	131.7		
標準偏差	µg/L				0.380			0.731			2.231			7.969				
変動係数	%				17.3			9.6			5.6			5.9				

*実測は3重測定以上とする

(7) 交差反応性

標準物質の測定データ(イミダクロプリド)

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 5.1.32 標準物質(イミダクロプリド)の測定データ

項目	単位	標準物質(イミダクロプリド)の測定データ						
		プレート ブランク	ブランク	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)	
所定濃度	µg/L	-	0	2	8	40	100	
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	
ELISA 実測* (吸光度)	1	-	0.040	2.258	1.877	1.423	0.642	0.339
	2	-	0.041	2.273	1.825	1.364	0.622	0.333
	3	-	0.041	2.256	1.826	1.39	0.627	0.326

表 5.1.33 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	2.2	1.03	10.5	0.413	

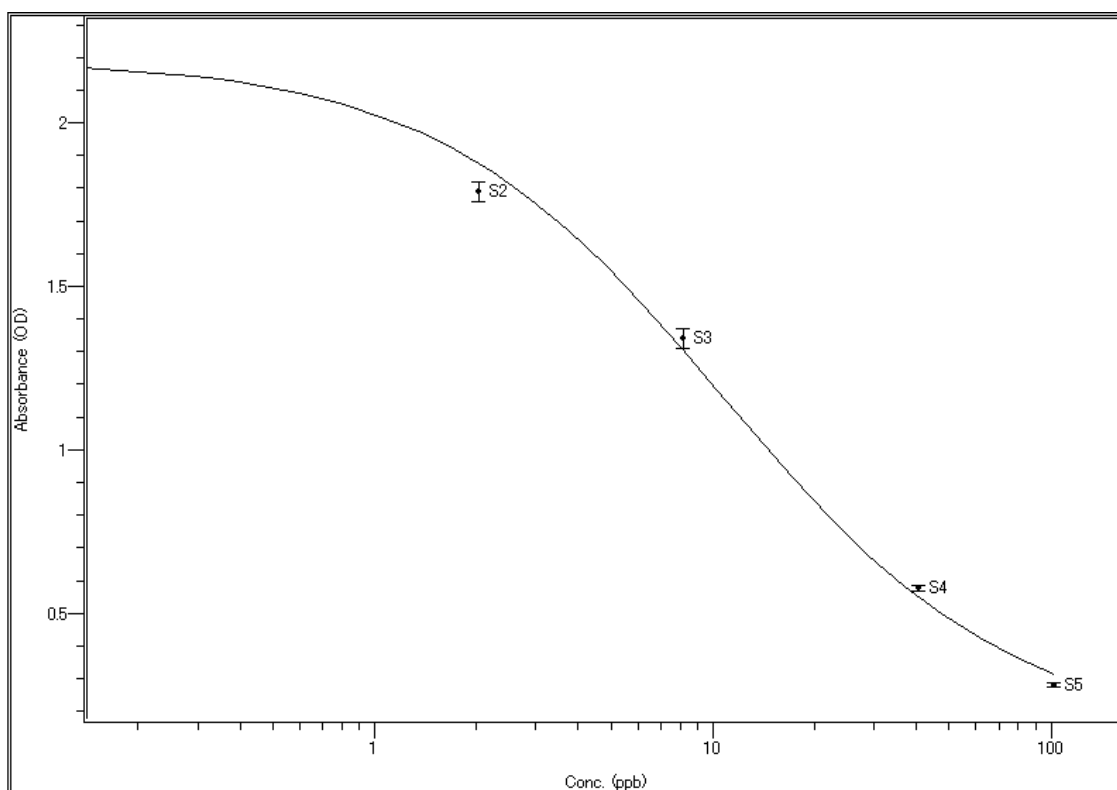


図 5.1.13 検量線

試験結果記録

類似物質の測定データは、以下に示すとおりである。

1) イミダクロプリド

表 5.1.34 交差反応性物質(イミダクロプリド)の測定データ

項目	単位	測定データ						
		プレート ブランク	溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4	溶液 S5	
所定濃度	µg/L	-	0	2	8	40	100	
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	
ELISA 実測* (吸光度)	1	-	0.042	2.277	1.921	1.387	0.656	0.352
	2	-	0.042	2.252	1.902	1.442	0.653	0.343
	3	-	0.049	2.295	1.877	1.385	0.653	0.342

2) チアクロプリド

表 5.1.35 交差反応性物質(チアクロプリド)の測定データ

項目	単位	測定データ						
		プレート ブランク	溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4	溶液 S5	
所定濃度	mg/L	-	0	0.05	0.2	1	2.5	
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	
ELISA 実測* (吸光度)	1	-	0.042	2.244	2.119	1.773	1.134	0.691
	2	-	0.042	2.284	2.125	1.828	1.133	0.707
	3	-	0.049	2.260	2.141	1.905	1.133	0.725

イミダクロプリドの吸光度曲線:

$$\text{吸光度} = (2.22 - 0.156) / (1 + (X / 10.8)^{1.05}) + 0.156 \dots\dots$$

$$X=0 \text{ の時の吸光度} = 2.22 \dots\dots$$

$$\text{プレートブランク} = 0.044 \dots\dots$$

より、50%発色阻害の吸光度 = 1.132

イミダクロプリドの 50%発色阻害濃度: 12.964 µg/L

チアクロプリドの吸光度曲線:

$$\text{吸光度} = (2.20 - 0.472) / (1 + (X / 555)^{1.23}) + 0.472 \dots\dots$$

$$X=0 \text{ の時の吸光度} = 2.20 \dots\dots$$

$$\text{プレートブランク} = 0.044 \dots\dots$$

より、50%発色阻害の吸光度 = 1.122

チアクロプリドの 50%発色阻害濃度: 920.608 µg/L

交差反応率(%) : $12.964 / 920.608 \times 100 = 1.4\%$

2) アセタミプリド

表 5.1.36 交差反応性物質(アセタミプリド)の測定データ

項目	単位	測定データ						
		プレート ブランク	溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4	溶液 S5	
所定濃度	mg/L	-	0	0.4	1.6	8	20	
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	
ELISA 実測* (吸光度)	1	-	0.042	2.158	1.979	1.588	0.703	0.445
	2	-	0.042	2.233	1.992	1.480	0.715	0.451
	3	-	0.049	2.210	1.986	1.632	0.707	0.442

アセタミプリドの吸光度曲線:

$$\text{吸光度} = (2.13 - 0.3) / (1 + (X / 2.66E+003)^{1.31}) + 0.3 \dots\dots$$

X=0 の時の吸光度 = 2.13 \dots\dots

プレートブランク = 0.044 \dots\dots

より、50%発色阻害の吸光度 = 1.087

アセタミプリドの 50%発色阻害濃度 : 3570.650 $\mu\text{g/L}$

交差反応率 (%) : $12.964 / 3570.650 \times 100 = 0.4\%$

表 5.1.37 交差反応性の試験結果

	イミダクロプリド	チアクロプリド	アセタミプリド
50%阻害濃度($\mu\text{g/L}$)	12.964	920.608	3570.650
交差率 (%)	100	1.4	0.4

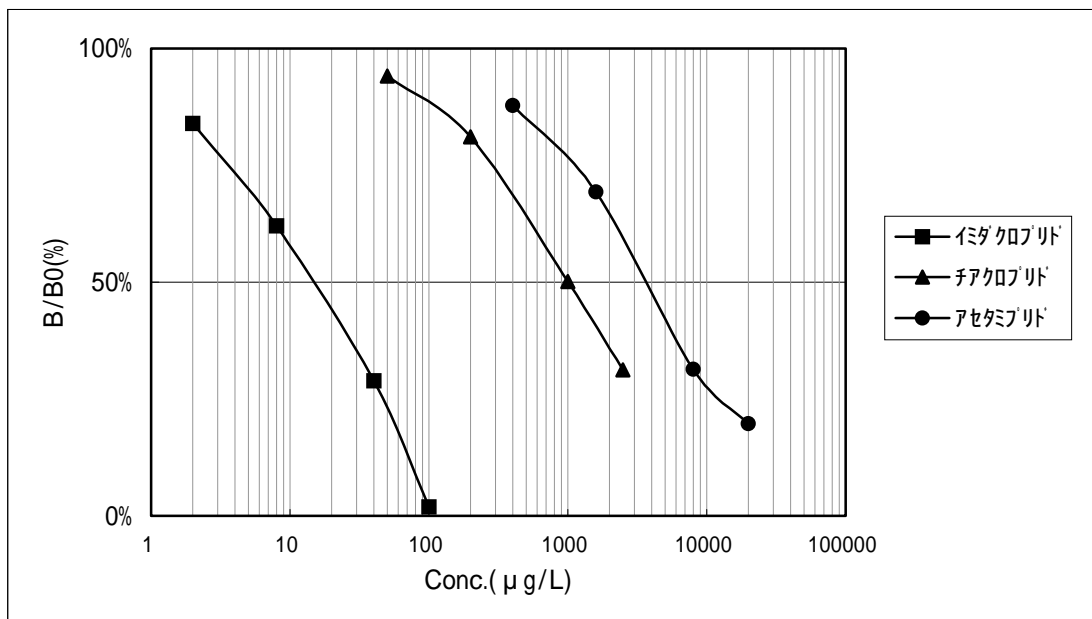


図 5.1.14 交差反応性試験結果

5.2 実用的な性能

(1) 回収特性

検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.2.1 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位						
		ブランク	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)	
所定濃度	μg/L	0	2	8	40	100	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測* (吸光度)	1	-	2.186	1.869	1.266	0.566	0.279
	2	-	2.197	1.757	1.237	0.542	0.267
	3	-	2.196	1.822	1.254	0.543	0.263

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	2.19	1.04	9.34	0.145	

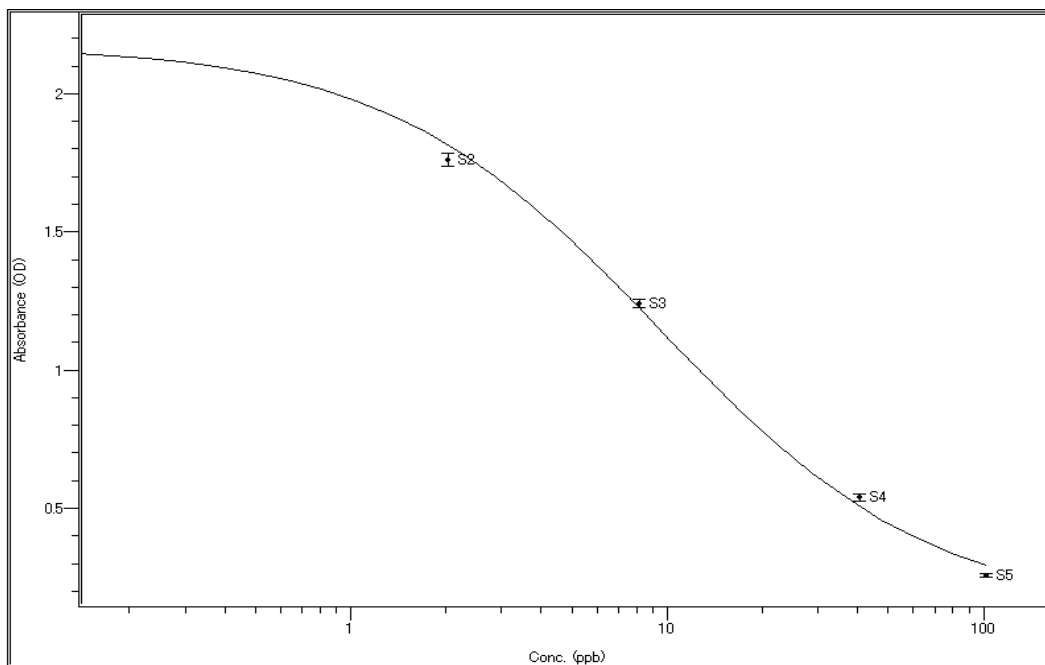


図 5.2.1 検量線

試験結果

河川水に測定範囲の中央付近(終濃度:8 µg/L)のイミダクロプリドを添加し、さらにフミン酸ナトリウムを添加(終濃度:0,1,5,10,50mg/L)した試験用試料溶液の測定結果は、以下のとおりであった。フミン酸ナトリウムの添加量が多くなるに従い、吸光度が低くなる傾向にあったが、50mg/L程度の量であれば実用上支障のないと考えられた。

表 5.2.3 回収特性の測定データ

項目		単位	試験用試料溶液(イミダクロプリド 8 µg/L 添加)				
フミン酸ナトリウム添加量		mg/L	0	1	5	10	50
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測* (吸光度)	1	-	1.322	1.242	1.259	1.214	1.207
	2	-	1.322	1.268	1.277	1.218	1.161
	3	-	1.289	1.289	1.310	1.279	1.235
	平均	-	1.311	1.267	1.282	1.237	1.201
	換算値	µg/L	7.141	7.779	7.552	8.229	8.808
	変動係数	%	3.7	4.5	4.9	6.7	7.1
	回収率	%	89	97	94	103	110

(2) 測定精度等

検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.2.4 検量線用標準溶液の測定データ

項目		単位	ブランク	STD1(S2)	STD2(S3)	STD3(S4)	STD4(S5)
濃度		µg/L	0	2	8	40	100
実測回数		回	3	3	3	3	3
ELISA 実測* (吸光度)	1	-	2.108	1.737	1.238	0.513	0.251
	2	-	2.150	1.709	1.215	0.499	0.239
	3	-	2.141	1.699	1.212	0.501	0.240

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	2.12	1.03	9.29	0.117	

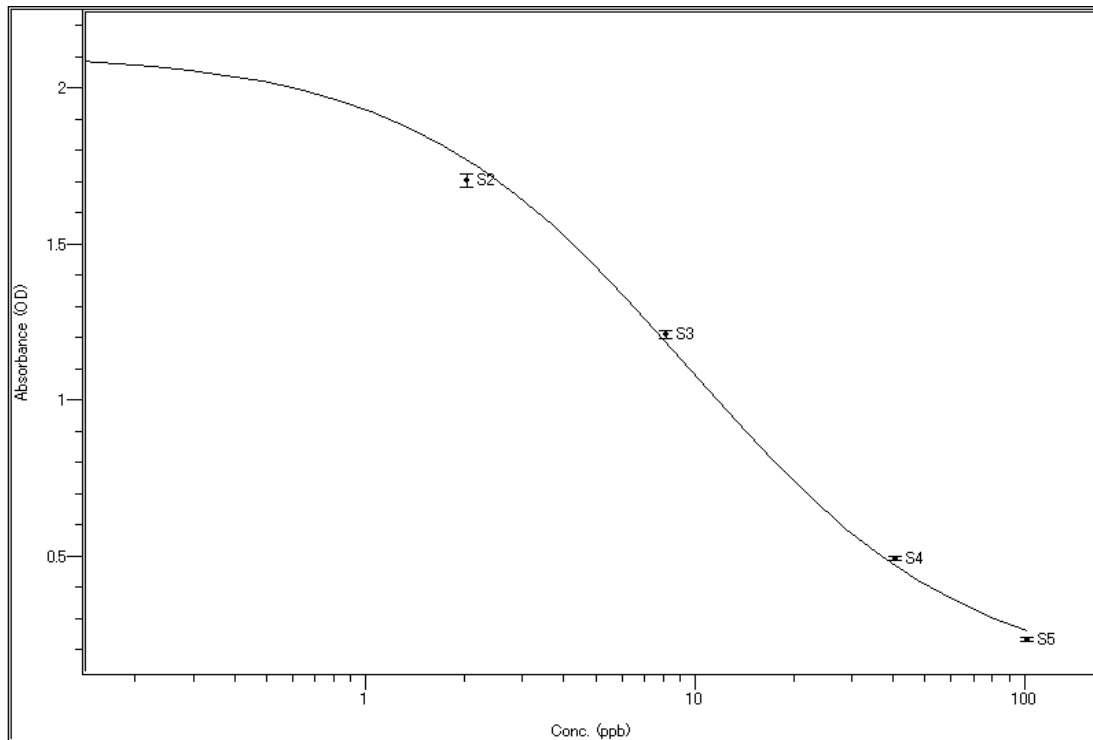


図 5.2.2 検量線

試験結果記録

複数の河川水における測定結果を表 5.2.6 に示した。河川水をろ過し直接 ELISA 法及び LC/MS/MS 法で測定したが、両法ともイミダクロプリドは検出されなかった。

また、これらの河川にイミダクロプリドを 4 µg/L になるよう添加した時の回収率は ELISA 法で 100 ~ 111%であった。

表 5.2.6 実試料での測定結果

項目		単位	イミダクロプリド 4 µg/L 添加 (括弧内は無添加のデータ)		
			濁川・北上川合流点	雫石川	北上川
実測回数		回	3	3	3
ELISA 法 (吸光度)	1	-	1.513 (2.115)	1.503 (2.061)	1.590 (1.996)
	2	-	1.546 (2.159)	1.549 (2.150)	1.572 (2.039)
	3	-	1.537 (2.173)	1.555 (2.146)	1.566 (2.104)
	平均	-	1.532 (2.149)	1.536 (2.119)	1.576 (2.046)
	換算値	µg/L	4.43 (nd)	4.39 (nd)	3.99 (nd)
	変動係数	%	4.0 (-)	6.7 (-)	3.0 (-)
	回収率	%	111 (-)	110 (-)	100 (-)
LC/MS/MS 法		µg/L	4.15 (nd)	3.97 (nd)	4.09 (nd)

*ELISA 法の検出下限 1 は 1.2 µg/L、検出下限 2 は 0.6 µg/L。LC/MS/MS の検出下限は 0.002 µg/L

6. 実証試験結果の検討と考察

(1) 製品性能の信頼性

実証試験で実施した基本性能7項目の全ての結果から、申請データ(2~100 µg/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イミダクロプリドを添加した実証試験の結果から、水質モニタリング等での実用化が可能であると考えられた。

(3) 製品操作等の簡便性

一般環境モニタリングでの使用を想定(試料の前処理なし)した場合、約 2.5 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 LC/MS/MS 法では、25 試料(3重測定)の測定に約2日が必要であることから操作の簡便性は高いといえる。

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》イミダクロプリド測定キットE

平成17年10月3日

岩 手 県

はじめに

本実証試験計画書は、「化学物質に関する簡易モニタリング技術 実証試験要領第2版(平成17年5月16日 環境省総合環境政策局)」(以下、「実証試験要領」という。)に基づいて選定された実証対象技術について、実証機関及び環境技術開発者の2者が協議、合意の上、実証試験要領に準じて策定したものである。

(実証機関)

岩手県環境保健研究センター
所 長 築田 幸

(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	7
4.4 実証試験の方法	9
(1) 基本的な性能試験	10
測定範囲試験	10
検出下限及び定量下限試験	10
繰返し再現性試験	10
日間再現性試験	10
期間再現性試験	10
プレート間再現性試験	10
交差反応性試験	11
(2) 実用的な性能試験	11
回収特性試験	11
測定精度試験	11
5. データの品質管理	12
6. データの管理、分析、表示	12
7. 監査	12
8. 評価	12

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
取扱説明書
物性表

1 . 実証試験の概要と目的

1.1 実証試験の概要と目的

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

本実証試験は、平成17年5月16日 環境省総合環境政策局が策定した実証試験要領(第2版)に基づいて選定された実証対象技術について、同実証試験要領に準拠して実証試験を実施することで、製品性能の信頼性等を客観的に実証するものである。

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

対象とする技術は、一般環境モニタリングでの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	岩手県環境保健研究センター
	住所	〒020-0852 岩手県盛岡市飯岡新田 1-36-1
	担当者所属・氏名	衛生科学部 上席専門研究員 高橋悟
	電話番号	019-656-5670
	FAX 番号	019-656-5671
	E-mail アドレス	t-satoru@pref.iwate.jp
環境技術開発者	企業名	株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー
	住所	〒601-8315 京都市南区吉祥院車道町 48 番地
	担当者所属・氏名	試薬事業部 開発・製造部 伊東 茂壽
	電話番号	075-692-1786
	FAX 番号	075-692-1790
	E-mail アドレス	Shigekazu.ito@horiba.com

2.2 実施体制

実証試験の実施体制は、下図に示すとおりである。

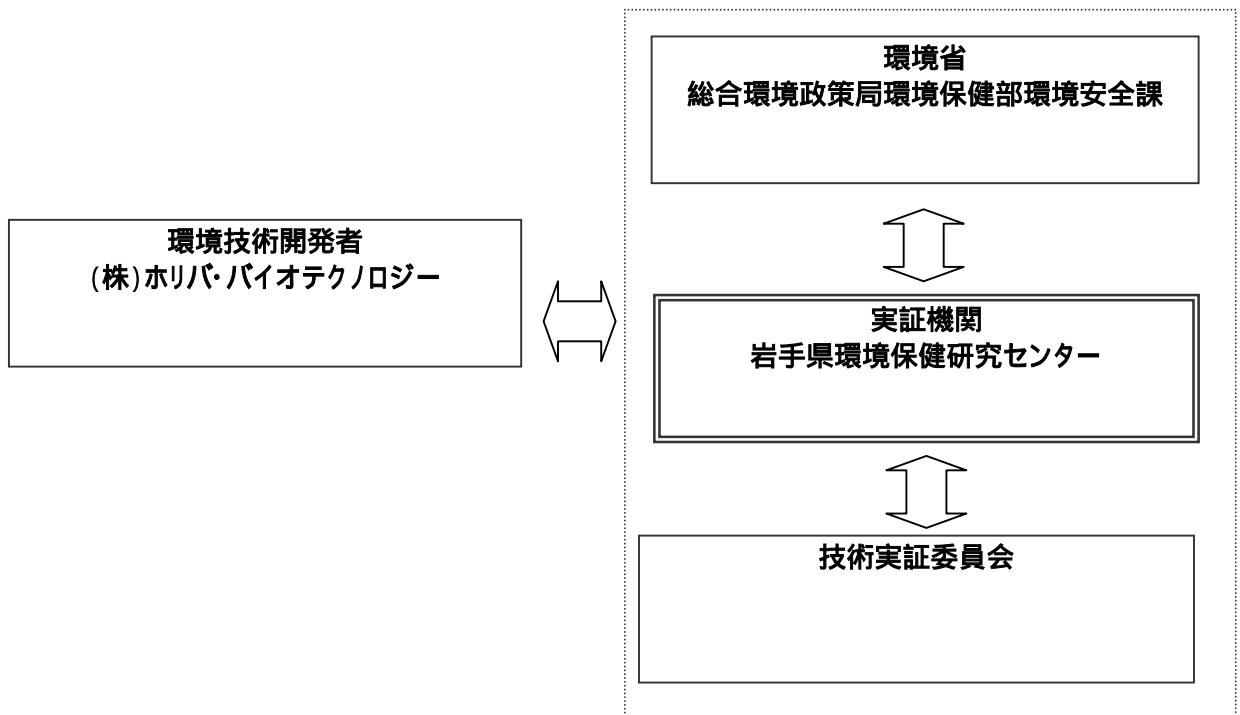


図 2.2 実証試験の実施体制

2.3 実証試験参加者の責任分掌

実証試験参加者とその責任分掌は、下表に示すとおりである。

表 2.3 実証試験参加者の責任分掌

実証試験 参加機関	責任分掌	参加者	
		部署	氏名
実証機関	実証試験の全体の総括責任者	環境科学 部 長	齋藤 憲光
	実証試験における ELISA 法の総括責任者	衛生科学部 上 席 専門研究員	高橋 悟
	実証試験における ELISA 法担当者のリーダー	環境科学部 上 席 専門研究員	佐々木 和明
	実証試験における ELISA 法担当者	環境科学部 専門研究員	伊藤 朋子
	実証試験における機器分析の総括責任者	衛生科学 部 長	小向 隆志
	実証試験における機器分析担当者のリーダー	衛生科学部 上 席 専門研究員	畠山 えり子
	実証試験における機器分析担当者	衛生科学部 上 席 専門研究員	梶田 弘子
	実証試験における精度管理の総括責任者	副 所 長	工藤 竹昭
	実証試験における精度管理担当者	企画情報部 上 席 専門研究員	佐々木 秀幸
	実証試験品質管理責任者	企画情報部 上 席 専門研究員	赤沼 英利
環境技術開発者	実証対象製品全体の総括責任者	開発・製造 部部長	伊東 茂壽
	実証対象製品の提供	開発・製造 部次長	門脇 篤
	実証対象製品の取扱説明書等の提供	開発・製造 部部長	伊東 茂壽
	実証試験実施上の参考情報の提供	開発・製造 部次長	門脇 篤

3. 実証試験の対象とする化学物質簡易モニタリング技術の概要

3.1 実証対象技術の原理

この実証対象製品は、イミダクロプリド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)のイミダクロプリド測定 ELISA キットである。

ELISA の原理は、競合反応(イミダクロプリド濃度が高い試料では吸光度が低く、イミダクロプリド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	イミダクロプリド測定キット E
型番	EL202-01
販売・製造元	株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー
重量(キット一式、g)	350g
価格(円)	105,000 円
分析対象物質	イミダクロプリド
対象環境媒体	水質・底質・生物・その他()
利用用途	環境水その他の水質モニタリング
標準試薬・種類	付属(調製済 / 調製要)
操作環境(室温)	常温(15 ~ 25)
製品保管条件	4 ~ 8
製品保証期間	製造後 9 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	2.0 ~ 100ppb (添付資料 1 - 1 ~ 2)
検出下限及び定量下限	検出下限: ppb 定量下限: ppb
繰返し再現性	標準偏差: 2.6 ~ 2.7 変動係数: 3.6 ~ 9.4% (添付資料 2)
日間再現性	標準偏差: 1.4 ~ 3.4 変動係数: 1.9 ~ 12.5% (添付資料 2)
期間再現性	保存安定性
プレート間再現性	標準偏差: 変動係数:
交差反応性	交差率: 1.3% (チアクロプリド) (添付資料 4)
	交差率: 0.4% (アセタミプリド) (添付資料 4)
その他	
2. 実用的な性能	
回収特性	回収率: 107.4 ~ 108.5% (添付資料 5)
測定精度等	機器分析との相関
その他	
試験責任者	伊東 茂壽
試験年月日	

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 10 月中旬～平成 18 年 12 月下旬とする。また、その期間のスケジュール（予定）は、下表に示すとおりである。

表 4.1 実証試験のスケジュール（予定）

	9月	10月			11月				12月		1月	2月	
	下旬	1週	4週	5週	1週	2週	3週	4週	1週	4週	4週	1週	3週
実証試験計画の策定													
対象技術の選定、計画書作成													
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													
付加的な検討													
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(イミダクロプリド)」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試薬を用い、キットが指定する調製方法で、濃度系列(以下、指定濃度系列)を作成する。

ウ. 吸光度の測定

吸光度は、マイクロプレートリーダー(バイオ・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:バイオ・ラッド社製マイクロプレートマネージャー5.2/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

イミダクロプリドの市販標準物質(和光純薬)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	イミダクロプリド	0, 2, 8, 40, 100 µg/L
測定範囲 日間再現性 期間再現性 プレート間再現性	イミダクロプリド	0, 2, 8, 40, 100 µg/L
検出下限及び定量下限	イミダクロプリド	2 µg/L
繰返し再現性	イミダクロプリド	8 µg/L
交差反応性	チアクロプリド	0, 0.1, 1, 10, 100(または 50) µg/L
	アセタミプリド	0, 0.1, 1, 10, 500(または 1000) µg/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

イミダクロプリド及び類似物質(チアクロプリド, アセタミプリド)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。(イミダクロプリドの50%阻害濃度/類似物質の50%阻害濃度)×100(%)で交差率を求め、類似物質の交差反応性を検討する。

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

(2) 実用的な性能試験

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

回収特性試験

グラスファイバーフィルター(アドバンテック社製 GA-100:孔径 1 μm)を用いて、河川水をろ過したる液を原水とし、それに測定範囲の中央付近となるように市販標準物質(イミダクロプリド)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:イミダクロプリド	8 μg/L
妨害物質:フミン酸ナトリウム	0, 1, 5, 10, 50 mg/L

測定精度試験

3地点から採取した河川水について、グラスファイバーフィルターによるろ過を行って測定する。

同一河川水について、所定のマニュアル(前処理法を含む)に従って機器分析を行い、ELISA法と機器分析法の実測値を比較し、環境試料への適用可能性について検討する。

また、製品の操作簡便性(測定時間、操作数)について、環境試料への適用性の観点から検討する。

5 . データの品質管理

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

6 . データの管理、分析、表示

(1) データの管理

実証試験で得られたデータは、識別し、適切に収集し、見出し付け、ファイリングし、10 年間維持した後、廃棄するものとする。

(2) データの分析と表示

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

7 . 監査

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

8 . 実証試験の評価

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

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

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

資料

技術の先進性、その他

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 - 191698「イミダクロプリド及びその類縁化合物のハプテン化合物、抗体および測定方法」
Analytica Chimica Acta427(2001) 211-219 “Development of a competitive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) based on monoclonal antibodies for chloronicotinoid insecticides and acetamiprid.”

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。

イミダクロプリドは「公共用水等における農薬の水質評価指針(指針値0.2mg/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。

測定範囲の設定（イミダクロプリド）

1. 検量線作成及び測定範囲の上限値と下限値の設定

1-1. 目的

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

1-2. 材料

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

1-3. 方法

1-3-1. 抗体プレート

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

1-3-2. 酵素標識物試液の調製

4 で保管してあるキット用酵素標識物試薬を30分間25 に静置した。

蒸留水6mLで溶解し、酵素標識物試液とした。

1-3-3. 検量線溶液の調製

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

メタノールで希釈し、25ppmの検量線用標準液を調製した。

検量線用標準液を下記表に示すように希釈列を調製した。

検量線溶液の調製（2倍希釈）

	1	2	3	4	5	6	7	8
検量線用標準液 (ppm)	25	12.5	6.25	1.6	0.78	0.39	0.1	0
希釈後 (ppb)	250	125	62.5	15.6	7.8	3.9	1.0	0

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

1-3-4. アッセイ

検量線溶液と酵素標識物溶液を等量混合して、混合試液とした。

各混合試液を抗体プレートに100 μ L/well分注した。

25 1時間静置した

吸引、洗浄 3 回実施した。

発色液を100 μ L/well分注した。

発色反応 25 10分間静置した。

反応停止

反応停止液100 μ L/well分注した。

測定（450nm）

測定機：スマートリーダー

1-4. 結果

(農薬添加区の吸光度) / (農薬無添加区の吸光度) の値 (B/Bo) について、
B/Bo=0.8付近の濃度 (測定下限; L) として2 ppb、及びB/Bo=0.2付近の濃度 (測定上限; H) として
100 ppbを選定して、測定範囲上限および下限に設定した。

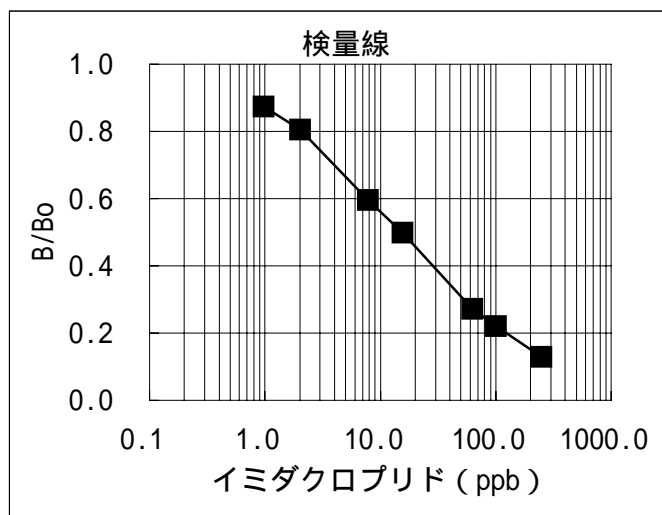


図1 . イミダクロプリド検量線 (B/Bo表示)

測定範囲の設定（イミダクロプリド）

2. 有意差検定

2-1. 目的

設定した測定範囲の下限値（2 ppb）と上限値（100 ppb）のBo及び試薬ブランクに対する有意差を確認する。

2-2. 材料

イミダクロプリド測定キット

2-3. 方法

2-3-1. キットの調製

4 保存キットを30分間25℃に静置した。

酵素標識物試薬に精製水6mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。

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

2-3-2. アッセイ

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

各混合試液を抗体プレートに100 µL/well分注した。

25℃ 1時間静置した。

吸引、洗浄 3 回実施した。

発色液を100 µL/well分注した。

発色反応 25℃ 10分間静置した。

反応停止

反応停止液100 µL/well分注した。

測定（450nm）

測定機：スマートリーダー

2-3-3. 検定方法

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

なお、試薬ブランクは発色液と反応停止液のみを添加したものである。

2-4. 結果

表1-1.

BoとLとの間の有意差検定

	Bo	L
平均	1.6475	1.3675
分散	0.00275767	0.004263
観測数	4	4
プールされた分散	0.00351033	
仮説平均との差異	0	
自由度	6	
t	6.68342148	
P(T<=t) 片側	0.00027187	
t 境界値 片側	1.94318091	
P(T<=t) 両側	0.00054375	
t 境界値 両側	2.44691364	

表1-2.

Hと農薬過剰量との間の有意差検定

	H	農薬過剰量
平均	0.3245	0.143
分散	6.0333E-05	1.26667E-05
観測数	4	4
プールされた分散	3.65E-05	
仮説平均との差異	0	
自由度	6	
t	42.4859364	
P(T<=t) 片側	5.6888E-09	
t 境界値 片側	1.94318091	
P(T<=t) 両側	1.1378E-08	
t 境界値 両側	2.44691364	

BoとLの t 検定結果

t > t 境界値片側 であり、BoとLの間には有意差が認められた。

Hと農薬過剰量の t 検定結果

t > t 境界値片側 であり、Hと農薬過剰量の間には有意差が認められた。

2-5. 考察

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

資料 2

再現性 (イミダクロプリド)

1. 目的

キットの再現性 (同時、日間) を確認する

2. 材料

イミダクロプリド測定キット

トマト

1000ppm 標準品メタノール溶液

3. 方法

3-1. 添加用標準液の調製

1000ppm 標準品メタノール溶液 (調製法は添付資料1-1参照)

メタノールを用いて下記の表の様に添加用標準液を調製した。

添加用標準液の濃度

	A	B
標準液 (ppm)	19.0	7.5

3-2. 測定試液の調製

農産物試料

磨砕：農産物を細断し、ミキサーでペースト状にした。

ペースト5gを 50mL遠沈管×3個にそれぞれ正確に量りとった。

添加用標準液をそれぞれ下記の表のように1mLずつ添加した。

添加用標準液の濃度およびサンプル中の農薬濃度

添加試料	添加用標準液調製濃度	ホモジネート中農薬濃度	抽出・希釈後濃度	添加量
	μg/mL	ppm	ppb	mL
A	19.0	3.8	74.5	1.0
B	7.5	1.5	29.4	1.0

遠沈管のふたを閉め、よく振った。

メタノール25mLを添加した。

振とう機 (120回/分) で30分間振とうした。

綿球を詰めたシリンジでろ過した。

ろ液を標準品を添加した農産物抽出液 (85%MeOH相当) とした。

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

3-3. キットの調製

4 で保管してある抗体プレート、酵素標識物試薬、標準試薬を取り出し、30分間25℃に静置した。

酵素標識物試薬に精製水6mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。
標準試薬に10%メタノール 1.0mLを添加、溶解して標準試液とした。

3-4. アッセイ

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

各混合試液を抗体プレートに100 μ L/well分注した。

25 1時間静置した。

吸引、洗浄3回実施した。
発色液を100 μ L/well分注した。

発色反応 25 10分間静置した。

反応停止
反応停止液100 μ L/well分注した。

測定 (450nm)

測定機：スマートリーダー

3-5. 同時再現性

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

3-6. 日間再現性

同一測定者が日を変えて3回行った。(8重測定)

4. 結果

表2-1. 同時再現性

	測定値 (ppb)	
	試料 A	試料 B
1	69.5	24.2
2	70.1	27.5
3	68.4	27.4
4	74.6	33.0
5	70.1	31.1
6	75.8	29.6
7	71.6	29.2
8	72.5	27.3
平均	71.6	28.7
標準偏差	2.6	2.7
変動係数(%)	3.6	9.4

表2-2. 日間再現性

	測定値 (ppb)	
	試料 A	試料 B
1日目	71.6	28.6
2日目	71.2	23.4
3日目	73.8	29.8
平均	72.2	27.3
標準偏差	1.4	3.4
変動係数(%)	1.9	12.5

5. 考察

トマトを磨砕したペーストにイミダクロプリドを添加した2試料を用いて、同時再現性および日間再現性を検討した。結果は、それぞれ表2-1及び2-2に示す通り、同時再現性で変動係数が3.6と9.4%、日間再現性で変動係数が1.9と12.5%であり、同時再現性及び日間再現性は良好であった。

資料3

保存安定性試験(イミダクロプリド)

1. 目的

キットの8 における保存安定性を確認する。

2. 材料

イミダクロプリド測定キット：2ロット

3. 方法

3-1. キットの調製

8 保存キットを30分間25 に静置した。

酵素標識物試薬に精製水6mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。

標準試薬に10%メタノール 1.0mLを添加、溶解して標準試液とした。

3-2. アッセイ

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

各混合試液を抗体プレートに100 μ L/well分注した。

25 1時間静置した。

吸引、洗浄3回実施した。

発色液を100 μ L/well分注した。

発色反応 25 10分間静置した。

反応停止

反応停止液100 μ L/well分注した。

測定(450nm)

測定機：スマートリーダー

4. 結果

4-1.1ロット目

表3-1 キットの保存安定性試験（1ロット目）

		保存日数					
		0	90	180	270	330	360
Bo	吸光度	1.563	1.330	1.403	1.388	1.176	0.900
	SD	0.074	0.088	0.098	0.204	0.067	0.027
	CV(%)	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8
	相対値	100.0%	85.1%	89.8%	88.8%	75.2%	57.6%
標準品L	吸光度	1.358	1.169	1.166	1.165	1.104	0.769
	B/Bo	0.869	0.879	0.831	0.840	0.939	0.854
	SD	0.064	0.072	0.053	0.112	0.063	0.042
	CV(%)	4.7	6.2	4.5	9.6	5.7	5.5
標準品H	吸光度	0.368	0.341	0.348	0.229	0.267	0.257
	B/Bo	0.235	0.256	0.248	0.165	0.227	0.285
	SD	0.018	0.007	0.019	0.013	0.026	0.031
	CV(%)	5.0	2.0	5.3	5.7	9.7	12.1
Boコントロール	吸光度	1.512	1.354	1.314	1.564	1.251	1.036
	SD	0.058	0.089	0.038	0.064	0.031	0.068
	CV(%)	3.8	6.6	2.9	4.1	2.5	6.5
	相対値	100.0%	89.6%	86.9%	103.4%	82.8%	68.5%

4-2.2ロット目

表3-2 キットの保存安定性試験（2ロット目）

		保存日数					
		0	90	180	270	330	360
Bo	吸光度	1.441	1.365	1.392	1.399	1.137	1.161
	SD	0.053	0.110	0.040	0.055	0.032	0.061
	CV(%)	3.7	8.0	2.9	3.9	2.8	5.3
	相対値	100.0%	94.7%	96.6%	97.1%	78.9%	80.6%
標準品L	吸光度	1.156	1.219	1.144	1.219	1.021	0.961
	B/Bo	0.803	0.893	0.822	0.871	0.898	0.828
	SD	0.011	0.040	0.076	0.029	0.022	0.066
	CV(%)	1.0	3.3	6.7	2.3	2.1	6.9
標準品H	吸光度	0.343	0.323	0.340	0.223	0.286	0.284
	B/Bo	0.238	0.236	0.244	0.160	0.251	0.244
	SD	0.005	0.006	0.008	0.015	0.016	0.016
	CV(%)	1.6	2.0	2.5	6.5	5.6	5.5
Boコントロール	吸光度	1.462	1.399	1.453	1.590	1.321	1.222
	SD	0.035	0.041	0.045	0.005	0.103	0.077
	CV(%)	2.4	2.9	3.1	0.3	7.8	6.3
	相対値	100.0%	95.7%	99.4%	108.8%	90.4%	83.6%

0日目の吸光度を基準とした相対値

0日目のB/Boを基準とした相対値

5. 考察

2ロットの保存安定性試験を実施した結果、2ロットとも8 保存で330日目までは使用可能であったので、本キットは9ヶ月使用可能である。

資料4

交差反応性(イミダクロプリド)

1. 目的

本キットの、類似構造農薬及び代表的農薬の交差反応性を確認した。

2. 材料

イミダクロプリド測定キット(標準試薬は除く)

対象農薬の標準品

- 1 イミダクロプリド
- 2 アセタミプリド
- 3 ニテンピラム
- 4 ジノテフラン
- 5 チアクロプリド
- 6 チアメトキサム
- 7 クロロタロニル
- 8 イミノクタジンアルベシル酸塩
- 9 キャプタン
- 10 フェンプロバトリン
- 11 アセフェート
- 12 ブプロフェジン
- 13 メパニピリム
- 14 ペルメトリン
- 15 ジエトフェンカルブ

3. 方法

3-1. 交差反応性測定用試液の調製

標準品をメタノールで溶解して段階希釈し希釈列を調製した
試験管に4mLの10%メタノールをとり、希釈列を各試験管に40 μ l添加して、
交差反応性測定用試液とした。

3-2. キットの調製

4 保存キットを30分間25 $^{\circ}$ Cに静置した。

酵素標識物試薬に精製水6mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。

3-3. アッセイ

試験管に酵素標識物試液と交差反応性測定用試液を等量混合し、混合試液とした。

各混合試液を抗体プレートに100 μ L/well分注した。

25 $^{\circ}$ C 1時間静置した。

吸引、洗浄3回実施した。

発色液を100 μ L/well分注した。

発色反応 25 $^{\circ}$ C 10分間静置した。

反応停止

反応停止液100 μ L/well分注した。

測定(450nm)

測定機: スマートリーダー

3-4. 交差反応性の算出

測定結果からIC₅₀値を求めたのち、交差反応性を算出した。

計算式は以下のとおりである。

交差反応性(%) = IC₅₀値(イミダクロプリド) / IC₅₀値(対象農薬) × 100

4. 結果

表3. 交差反応性一覧

農薬	交差反応性(%)
イミダクロプリド	100
アセタミプリド	0.4
ニテンピラム	<0.1
ジノテフラン	<0.1
チアクロプリド	1.3
チアメトキサム	<0.1
クロロタロニル	<0.1
イミノクタジンアルベシル酸塩	<0.1
キャプタン	<0.1
フェンプロパトリン	<0.1
アセフェート	<0.1
ブプロフェジン	<0.1
メパニピリム	<0.1
ペルメトリン	<0.1
ジエトフェンカルブ	<0.1

5. 考察

各種農薬に対する本キットの交差反応性は、表に示す通りで、対象農薬に交差反応性は認められなかった。

資料 5

添加回収試験（イミダクロプリド）

1. 目的

農産物に添加したイミダクロプリドの回収率を確認する。

2. 材料

イミダクロプリド測定キット

ほうれんそう

1000ppm 標準品メタノール溶液

3. 方法

3-1. 添加用標準液の調製

1000ppm 標準品メタノール溶液（調製法は添付資料1-1参照）

メタノールを用いて下記の表の様に添加用標準液を調製した。

添加用標準液の濃度

	A	B	C
標準液（ppm）	25.5	12.8	2.6

3-2. 測定試液の調製

農産物試料

磨砕：農産物を細断し、ミキサーでペースト状にした。

ペースト5gを50mL遠沈管×3個にそれぞれ正確に量りとった。

添加用標準液をそれぞれ下記の表のように1mLずつ添加した。

添加用標準液の濃度およびサンプル中の農薬濃度

添加試料	添加用標準液	ホモジネート	抽出・希釈	添加量
	調製濃度	中農薬濃度	後濃度	
	ppm	ppm	ppb	mL
A	25.5	5.10	100.0	1.0
B	12.8	2.56	50.2	1.0
C	2.6	0.51	10.0	1.0

遠沈管のふたを閉め、よく振った。

メタノール25mLを添加した。

振とう機（120回/分）で30分間振とうした。

綿球を詰めたシリンジでろ過した。

ろ液を標準品を添加した農産物抽出液（85%メタノール相当）とした。

標準品を添加した農産物抽出液1mLを100mL瓶にとり、7.5mLの蒸留水を添加し、よく混和した。（8.5倍希釈）これを測定試液とした。

3-3. キットの調製

4℃で保管してある抗体プレート、酵素標識物試薬、

標準試薬を取り出し、30分間25℃に静置した。

酵素標識物試薬に精製水6mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。

標準試薬に10%メタノール 1.0mLを添加、溶解して標準試液とした。

3-4. アッセイ

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

各混合試液を抗体プレートに100 μ L/well分注した。

25 1時間静置した。

吸引、洗浄3回実施した。
発色液を100 μ L/well分注した。

発色反応 25 10分間静置した。

反応停止
反応停止液100 μ L/well分注した。

測定 (450nm)

測定機：スマートリーダー

4 . 結果

表4. 添加回収試験

添加濃度 (ppm)	回収濃度(ppm)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
5.00	5.7	113.2	108.5 \pm 4.9
	5.5	109.0	
	5.2	103.3	
2.50	3.1	122.9	108.5 \pm 15.5
	2.8	110.4	
	2.3	92.2	
0.50	0.64	128.5	107.4 \pm 18.9
	0.46	92.2	
	0.51	101.5	

5 . 考察

ほうれんそうにイミダクロプリドを添加した試料について、添加回収試験を行った。
表4に示すように、3濃度での回収率が107.4、108.5、108.5%と良好な結果が得られた。

なお、回収率の計算は、下記のとおりである。

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

スマートアッセイ シリーズ イミダクロプリド測定キットE

1. はじめに

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

2. 測定原理

本キットは、環境水中のイミダクロプリドを直接競合 ELISA 法で測定するものです。

イミダクロプリド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、イミダクロプリド (標準溶液または試料溶液) とイミダクロプリド酵素標識物溶液の等量混合液を加えて競合反応させます。反応終了後、未反応物を洗浄除去し発色試薬を加えると、固相化抗体に結合した酵素標識物の酵素反応によって発色試薬中のテトラメチルベンジジンが酸化され、発色します。発色反応を発色停止試薬で停止させた後、450 nm の吸光度を測定します。吸光度は、標準溶液または試料溶液中のイミダクロプリド濃度が高いほど低下します。標準溶液のイミダクロプリド濃度とその吸光度の関係からイミダクロプリド濃度を求めます。

3. 測定キットの特徴

- 1) **高感度** - イミダクロプリドを 2~100 ppb の範囲で測定できます。
- 2) **簡便** - 機器分析法に比べ試料の煩雑な前処理を必要とせず、簡易な操作で測定できます。
- 3) **迅速** - 前処理が簡単なため、短時間で多くの試料を同時に測定できます。
- 4) **低コスト** - 高価な機器を必要とせず、測定場所を選ばないため、コストを安くできます。

4. 測定キットの構成

1 キットに含まれる試薬の内訳は、第 1 表の通りです。

第 1 表 キットの構成

品名	容量	剤型	数量
イミダクロプリド抗体プレート	8 ウエル×12 列 (96 ウエル)	乾燥品	1 枚
イミダクロプリド標準試薬 C1 (2 ppb)	1 mL	凍結乾燥品	2 バイアル
イミダクロプリド標準試薬 C1 (8 ppb)	1 mL	凍結乾燥品	2 バイアル
イミダクロプリド標準試薬 C1 (40 ppb)	1 mL	凍結乾燥品	2 バイアル
イミダクロプリド標準試薬 C1 (100 ppb)	1 mL	凍結乾燥品	2 バイアル
イミダクロプリド酵素標識物試薬	6 mL	凍結乾燥品	2 バイアル
洗浄試薬 (10 倍濃縮)	50 mL	液体	1 バイアル
発色試薬	13 mL	液体	1 バイアル
発色停止試薬	13 mL	液体	1 バイアル
プレートシール			1 枚

5. 測定に必要な材料・装置

- (1) **試薬**
イミダクロプリド測定キット E : ホリバ・バイオテクノロジー社製
精製水
メタノール : 環境分析用
10%メタノール : 精製水を用いて 10 倍希釈
- (2) **器具**
マイクロピペット (50~200 μ L, 1000 μ L) および専用チップ
メスシリンダー : 500 mL
試験管 : ガラス製、10 mL
ガラス繊維フィルター (ADVANTEC 社製 GLASS FIBER FILTER GA-55 または同等品)
- (3) **装置**
ストップウォッチ : 秒単位まで表示
試験管ミキサー
マイクロプレートリーダー : スマートリーダー (ホリバ・バイオテクノロジー社製)
マイクロプレート洗浄機 : スマートウォッシャー (ホリバ・バイオテクノロジー社製)

6. 溶液の調製

- (1) イミダクロプリド抗体プレート
そのまま用います。
- (2) イミダクロプリド標準溶液
イミダクロプリド標準試薬 C1、C2、C3 および C4 に 10%メタノール 1 mL をマイクロピペットで加えて溶解し、それぞれイミダクロプリド標準溶液 C1 から C4 とします。溶解後の濃度は、それぞれ 2、8、40 および 100 ppb です。
- (3) イミダクロプリド酵素標識物溶液
酵素標識物試薬に精製水 6 mL を加えて溶解し、イミダクロプリド酵素標識物溶液とします。
- (4) 洗浄溶液
洗浄試薬に、精製水 450 mL をメスシリンダーで加えて希釈し、洗浄溶液とします。

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

7. 測定操作

1) 測定方法

ろ過

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

混合液の調製

イミダクロプリド標準溶液または試料溶液 150 μL をマイクロピペットで試験管に取り、それぞれにイミダクロプリド酵素標識物溶液 150 μL をマイクロピペットで加えて混合し、標準混合液または試料混合液とします。

競合反応

抗体プレートのウェルに、標準混合液または試料混合液 100 μL ずつをマイクロピペットで分注します。ついで、ストリップの使用ウェルに合わせて切断したプレートシールを貼り、室温 (15 ~ 25) 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、洗浄溶液 300 μL で 3 回洗浄します。
ウェルの底に洗浄溶液が残っていないことを確認して下さい。
測定の迅速性と定量精度を高めるため、専用の洗浄機のご使用をお勧めします。

発色反応、発色反応停止

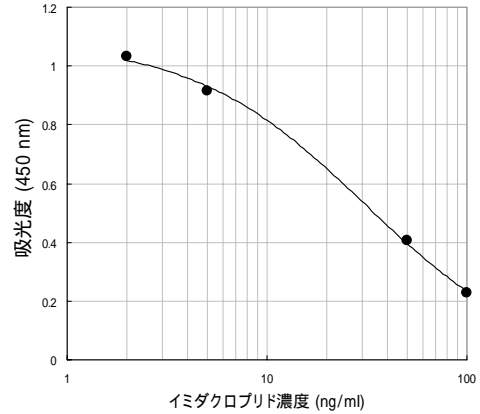
マイクロピペットで発色試薬 100 μL を加えて室温 (15 ~ 25) で 10 分間反応させた後、発色停止試薬 100 μL をマイクロピペットで添加して下さい。
発色試薬を加えると時間と共に青色に、発色停止試薬を加えると瞬時に黄色に呈色します。
各ウェルの発色反応時間が一定になるように注意して下さい。

吸光度測定

波長 450 nm における吸光度を、マイクロプレートリーダーにより測定します。
発色停止後、15 分以内に吸光度を測定して下さい。
“スマートリーダー”を使用いただくことにより、煩雑な濃度計算が自動的になされ、表示されます。

2) 試料中のイミダクロプリド濃度の計算

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



$$Y = -0.033 + (1.087 + 0.033) / (1 + 10^{(\log X - \log 31.2)})$$

図 1 回帰曲線および回帰式の例

8. 測定キットの反応特性

本キットに用いている抗体の各種農薬に対する交差反応は、第 2 表の通りです。

第 2 表 各種農薬との交差反応性

農薬	商品例	交差反応性 (%)
イミダクロプリド	アドマイヤー	100
チアクロプリド	パリアード	1.3
アセタミプリド	モスピラン	0.4
アセフェート	オルトラン	<0.1
イミノクダシアベシル酸塩	ベルクート	<0.1
キャプタン	オーソサイド	<0.1
ジエトフェカルブ	バウミル	<0.1
ジメチアト	スタークル	<0.1
チアメトキサム	アクタラ	<0.1
ニテンピラム	ベストガード	<0.1
フェンプロパトリン	ロディー	<0.1
プロフェシ	アロード	<0.1
ペレメトリン	アディオ	<0.1
メピピリム	フリカ	<0.1
TPN(クロロタロコ)	ダエール	<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：パッケージの外面上に表示してあります。

10. 注意事項

使用前に、取扱説明書をよくお読みいただき、注意事項をお守りください。

1) 一般的な注意事項

本キットは、食品衛生・環境等に関わる自主検査用です。測定結果の判断と運用は、すべてお客様自身の責任で行ってください。
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。

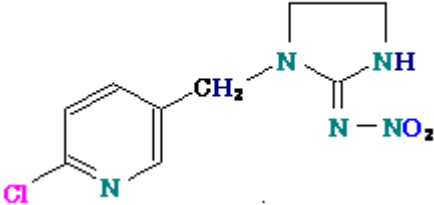
吸飲したり、皮膚と接触したりすると有害な試薬類が含まれています。身体に異常を感じた場合は、直ちに医師の手当てを受けてください。
保管・廃棄する場合には、衛生面、環境面に十分配慮し、法規を遵守してください。イミダクロブリドを含む廃液、発色反応停止後の液(希硫酸を含む)は回収し、環境中に廃棄しないでください。
本キットを一度に使い切らなかった場合は、各容器を密封し、取扱説明書と共に保管してください。

2)測定操作上の注意事項

本キットは、使用 30 分程前に冷蔵庫から取出し、室温に戻してからご使用ください。
異なるロットの試薬を組合わせて使用しないでください。
マイクロプレートは、各 8 ウェルずつのストリップタイプになっていますので、必要なウェル数のみを用意し、残りはラミネート袋に戻し、密封して冷蔵保存してください。また、抗体プレートを取扱う際は、裏面を汚さないようにしてください。
正確な分析を行うため、試薬の溶解・希釈操作は可能な限り正確に行ってください。また、各反応時間を厳守してください。
検量線は、測定ごとに作成してください。
測定は少なくとも 2 重測定で行ってください。
測定は、検量線範囲内の濃度(2 ~ 100 ppb)で行って下さい。100ppb を超える高濃度の測定試料の場合は、10%メタノールで追加希釈した後再測定してください。
競合反応後の洗浄ではウェルの底に洗浄溶液が残っていないことを確認して下さい。
発色および発色停止反応時の各ウェルの反応時間が一定になるように調整してください。

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>

物性表

実証機関	岩手県	環境技術開発者	(株)ホリバ・バイオテクノロジー
製品の名称	イミダクロプリド測定キットE		
測定対象物質名	イミダクロプリド		
化学名	1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine		
分子式(分子量)	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂ (255.7)	CAS No.	105827-78-9
構造式			
物理化学的性状	外 観 等	無色結晶、弱い特異臭	
	融 点	143.8	
	沸 点	分解	
	揮 発 性	無し	
	比 重	1.543 (20)	
	溶 解 性	0.05g / 水 100ml (20)	
	そ の 他	ジクロロメタン、ジメチルスルホキシドに可溶	
	安 定 性	酸化剤に接触すると反応する	
用 途	ピリジン、イミダゾリジン系 殺虫剤		
備 考			