

環境技術実証モデル事業
化学物質に関する簡易モニタリング技術分野

化学物質に関する簡易モニタリング技術
実証試験結果報告書

環境技術開発者	株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー
技術・製品の名称	技術： ELISA法（酵素免疫測定法） 製品の名称： カルバリル測定キットE

平成18年3月

兵 庫 県

はじめに

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

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

（実証項目）

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

本報告書は、実証試験計画書に基づき実施した試験結果を取りまとめたものである。

（実証機関）

兵庫県立健康環境科学研究所

所長 吉村 幸男

要 約

製品名称	カルバリル測定キット E
環境技術開発者	株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー
実証機関	兵庫県
対象物質	殺虫剤 カルバリル
実証試験の実施期間	平成 17 年 10 月 27 日 ~ 12 月 14 日

1．実証対象技術の概要

この実証対象製品は、申請者が開発したカルバリルに対する特異的なモノクローナル抗体を応用した、環境水等のカルバリル測定 ELISA キットである。

この ELISA キットの反応原理は競合反応(カルバリル濃度が高い試料では吸光度が低く、カルバリル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	カルバリル測定キット E
型番	EL208-01
販売・製造元	販売・製造：株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー
重量（キット一式，g）	350g
価格（円）	99,750 円
分析対象物質	殺虫剤 カルバリル
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（調整済／調整要）
操作環境（室温）	室温（15～25 ）
製品保管条件	4～8
製品保証期間	製造後 12 ヶ月間
同時測定数（最多）	46 試料（2 重測定）
測定時間	2～3 時間

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。

4. 実証試験結果の概要

項目	結果概要	
実証機関	兵庫県	
製品名称	カルバリル測定キット E	
環境技術開発者	株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー	
対象物質	殺虫剤 カルバリル	
実証試験計画書の策定	平成 17 年 10 月 3 日	
実証試験の実施期間	平成 17 年 10 月 27 日～12 月 14 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 1.5～30µg/L (4 濃度系列) での CV: 3.7～14.8%, 相対値: 111～183% 試験で得られた測定範囲: 1.5～30µg/L	1.5～30µg/L
検出下限および定量下限	調製濃度 1.5µg/L の SD から求めた場合 検出下限 (3SD: 検出下限 1): 0.47µg/L 定量下限 (10SD): 1.6µg/L 濃度 0µg/L の吸光度から求めた場合 検出下限 2: 1.0µg/L	測定下限: 1.5µg/L
繰返し再現性	調製濃度 5µg/L での CV: 4.2% (SD: 0.23µg/L)	測定濃度 3.6～22.7µg/L での CV: 6.9～11.4% (ほうれん草ホモジェネートへの添加試料)
日間再現性	調製濃度 1.5～30µg/L で、同一週の 3 日間に測定した場合の CV: 14.9～19.7% (19.7%は 30µg/L の場合)	測定濃度 2.6～21.9µg/L での CV: 5.7～36.4% (ほうれん草ホモジェネートへの添加試料)
期間再現性	調製濃度 1.5～30µg/L で、1 ヶ月を隔てて 2 回測定した場合の CV: 最初: 3.7～14.8 % 1 ヶ月後: 3.0～9.0 %	製品保証期間 12 ヶ月, 保存安定性試験結果 5 ヶ月
プレート間再現性	調製濃度 1.5～30µg/L で、同ロットプレート 2 枚, 異ロットプレート 1 枚間の CV: 1.5～38.1% (38.1%は 30µg/L の場合)	-
交差反応性	交差反応率: ベンダイオカルブ: 29.5% フェントエート: <0.1% ピリプチカルブ: 0.9%	交差反応率: ベンダイオカルブ: 26.1% フェントエート: 2.8%
(2) 実用的な性能		
回収特性	対象物質を 5µg/L 添加した河川水に、フミン酸ナトリウムを添加 (0～50mg/L) した場合の回収影響率: 97～133%	ほうれん草ホモジェネートへの添加回収率: 添加濃度 150µg/L: 124.9% 500µg/L: 144.3% 750µg/L: 142.5%
測定精度等	3 河川水全てについて、ELISA 法、機器分析法 (GC/MS) とともに不検出のため、標準を低濃度 (0.2µg/L) 添加し、100 倍濃縮により測定。変動係数、回収率とともに概ね良好。GC/MS の結果との相関は r=0.992。	-

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 項目の結果から、メーカーの申請どおり 1.5 ~ 30 μ g/L の濃度範囲において概ね妥当な製品性能の信頼性を確認した。ただし、検量線の曲線部分に当たる特に高濃度側で、実測濃度（相対値）が高めに出る傾向があり、留意する必要がある。

2) 一般環境モニタリングでの実用性

妥当な感度、精度を有しており、前処理で適当な濃縮を行えばさらに感度の上昇が期待される。本試験の検討範囲では環境水中のマトリックスの影響は軽微と考えられることから、実用化は可能である。

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、試料の前処理から測定結果が得られるまで 4 ~ 5 時間であり、同時に約 25 試料（3 重測定）の測定が可能となる。したがって、操作の簡便性は高いと言える。取扱説明書の記述も概ね妥当である。

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) ELISA 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) 検出下限および定量下限	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	14
(1) 回収特性	14
(2) 測定精度等	15

5. 試験結果	16
5.1 基本的な性能	16
(1) 測定範囲	16
(2) 検出下限および定量下限	18
(3) 繰返し再現性	20
(4) 日間再現性	22
(5) 期間再現性	26
(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	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	41
(1) 製品性能の信頼性	41
(2) 一般環境モニタリングでの実用性	41
(3) 製品操作等の簡便性	41

1. 実証試験の概要

1.1 実証対象製品のデータ

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

表 1 実証対象製品のデータ

項目	記入欄
技術・製品の名称	ELISA 法（酵素免疫測定法） カルバリル測定キット E
実証申請者	株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー
実証試験実施者	兵庫県立健康環境科学研究センター
実証試験実施場所	〒654-0037 神戸市須磨区行平町 3-1-27
実証試験実施期間	平成 17 年 10 月 27 日 ~ 12 月 14 日
製品名	カルバリル測定キット E
型番	EL208-01
販売・製造元	販売・製造 : 株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー
重量 (g)	350g
価格 (円)	99,750 円
分析対象物質	殺虫剤 カルバリル
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 (調整済 / 調整要)
操作環境 (室温)	室温 (15 ~ 25)
製品保管条件	4 ~ 8
製品保証期間	製造後 12 ヶ月間
同時測定数 (最多)	46 試料 (2 重測定)
全体測定時間	2~3 時間

1.2 実証試験結果

環境技術開発者が実証申請書に示した基本的な性能に関するデータと実証試験結果とは概ね一致した。ただし、検量線の曲線部分に当たる特に高濃度側で、実測濃度(相対値)が高めに出る傾向がみられた。実用的な性能に関しては概ね良好な結果が得られた。

(1) 基本的な性能

測定範囲

申請データ：1.5 ~ 30 µg/L 実証データ：1.5 ~ 30 µg/L

検出下限及び定量下限

申請データ：測定下限 1.5 µg/L (検出下限，定量下限のデータなし)

実証データ：検出下限 1 0.47 µg/L，検出下限 2 1.0 µg/L，定量下限 1.6 µg/L

検出下限 1：指定濃度系列下限付近の濃度についての 8 回繰り返し測定で得られた測定濃度の標準偏差 (SD) より，3 倍の値 (3SD) として得られた値。定量下限はこの標準偏差の 10 倍の値 (10SD)。

検出下限 2：指定濃度系列 0 濃度についての 10 回繰り返し測定で得られた吸光度の標準偏差 (SD) の 3SD 値を，0 濃度の吸光度から差し引いた吸光度より，検量線で換算された値。

繰り返し再現性

申請データ：測定濃度 3.6 ~ 22.7µg/L における変動係数 6.9 ~ 11.4%

(ほうれん草ホモジェネートへの添加試料)

実証データ：測定濃度 5 µg/L における変動係数 4.2%

日間再現性

申請データ：測定濃度 2.6 ~ 21.9µg/L における変動係数 5.7 ~ 36.4%

(ほうれん草ホモジェネートへの添加試料)

実証データ：測定濃度 1.5µg/L における変動係数 14.9%，3µg/L における変動係数 18.4%，15µg/L における変動係数 19.6%，30µg/L における変動係数 19.7%

期間再現性

申請データ：製品保証期間 12 ヶ月，保存安定性試験結果 5 ヶ月

実証データ：測定濃度 1.5 μ g/L における変動係数 6.5～8.5%，3 μ g/L における変動係数 4.4～9.0%，15 μ g/L における変動係数 3.0～3.7%，30 μ g/L における変動係数 1.8～14.8%

プレート間再現性

申請データ：記述なし

実証データ：測定濃度 1.5 μ g/L における変動係数 3.6%，3 μ g/L における変動係数 1.5%，15 μ g/L における変動係数 8.0%，30 μ g/L における変動係数 38.1%

交差反応性

申請データ：ベンダイオカルブ 26.1%，フェントエート 2.8%

実証データ：ベンダイオカルブ 29.5%，フェントエート <0.1%，
ピリプチカルブ 0.9%

(2) 実用的な性能

回収特性

申請データ：回収率 124.9～144.3%（150～750 μ g/L：ほうれん草ホモジェネートへの添加）

実証データ：回収影響率 97～133%（5 μ g/L：河川水への添加）

妨害物質：フミン酸ナトリウム 0～50mg/L

測定精度等

申請データ：記述なし

実証データ：実試料（河川水）3 試料について，機器分析法（GC/MS）による結果とともに不検出であったので，標準を低濃度（0.2 μ g/L）添加し，100 倍の濃縮を行って測定した。いずれの添加試料でも，変動係数，回収率とともに概ね良好な結果が得られ，機器分析による結果との相関は $r=0.992$ であった。

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

担当者所属・氏名：試薬事業部 開発・製造部 部長 伊東 茂壽

住 所：〒601-8315 京都市南区車道町 48 番地

電話番号：075-692-1786

F A X 番号：075-692-1790

e-mail アドレス：Shigekazu.ito@horiba.com

2.2 実証対象技術の原理

本実証対象製品は、殺虫剤のカルバリルに対する特異的なモノクローナル抗体を応用した、水質中のカルバリル測定 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、表 1 に示したとおりである。

3. 実証試験実施体制

3.1 実証試験申請者

所属部署 : 兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部

担当者氏名 : 中野 武

住 所 : 〒654-0037 神戸市須磨区行平町 3-1-27

電話番号 : 078-735-6911

F A X 番号 : 078-735-7817

e-mail アドレス : Takeshi_nakano@pref.hyogo.jp

3.2 実証試験実施者

所属部署 : 兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部

担当者氏名 : 古武家 善成

住 所 : 〒654-0037 神戸市須磨区行平町 3-1-27

電話番号 : 078-735-6911

F A X 番号 : 078-735-7817

e-mail アドレス : Yoshinari_kobuke@pref.hyogo.jp

3.3 実証試験実施場所

(1) ELISA 法

兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部

(2) 機器分析法

兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部

3.4 実証試験実施期間

平成 17 年 10 月 27 日 ~ 平成 17 年 12 月 14 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」および「4.3 実用的な性能」において、以下の方法は共通である。

(1) 製品の操作

製品の操作にあたっては、製品の取扱説明書を遵守するとともに、ELISA 分析に係わる品質管理マニュアルの試験操作手順（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希釈系列を調製した。

(3) 吸光度の測定

吸光度は、マイクロプレートリーダー（日本バイオ・ラッドラボラトリーズ(株)社製マイクロプレートリーダー モデル 680）で測定し、検量線作成用標準溶液および各試験用試料溶液の吸光度とした。

(4) 検量線の作成

プレート毎に同時に波長 450nm で測定した標準溶液指定濃度系列の吸光度（3 重測定の平均値）から、4-parameter logistic fitting 後、検量線を作成した（検量線作成用の解析ソフト：バイオメトリクス社製 デルタソフト）。

(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	殺虫剤 カルバリル
対象製品名	カルバリル測定キット E
製品番号	ロット番号 E-CBR001F
製造年月日	-（有効期限：2006.9）
測定範囲（製品仕様）	1.5 ~ 30 μ g/L
試験日時	平成 17 年 10 月 27 日 17:00~20:00
試験場所	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部
試験時室内温度	22
使用した市販標準品	カルバリル標準品 残留農薬試験用 和光純薬工業(株)社製 製品番号 148-03831 ロット番号 YPH8135
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5.2/PC（Windows） （日本バイオ・ラッドラボラトリーズ社製）
試験機関・担当者	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部 古武家善成

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

(2) 検出下限および定量下限

試験条件

本製品の検出下限およ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 検出下限および定量下限の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・検出下限および定量下限（標準試料試験）
対象物質	殺虫剤 カルバリル
対象製品名	カルバリル測定キット E
製品番号	ロット番号 E-CBR001F
製造年月日	-（有効期限：2006.9）
測定範囲（製品仕様）	1.5 ~ 30 µg/L
試験日時	平成 17 年 10 月 27 日 17:00 ~ 20:00
試験場所	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部
試験時室内温度	22
使用した市販標準品	カルバリル標準品 残留農薬試験用 和光純薬工業(株)社製 製品番号 148-03831 ロット番号 YPH8135
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5.2/PC (Windows) (日本バイオ・ラッドラボラトリーズ社製)
試験機関・担当者	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部 古武家善成

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

(3) 繰返し再現性

試験条件

本製品の繰返し再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.3 繰返し再現性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・繰返し再現性（標準試料試験）
対象物質	殺虫剤 カルバリル
対象製品名	カルバリル測定キット E
製品番号	ロット番号 E-CBR001F
製造年月日	-（有効期限：2006.9）
測定範囲（製品仕様）	1.5 ~ 30 μ g/L
試験日時	平成 17 年 10 月 27 日 17:00 ~ 20:00
試験場所	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部
試験時室内温度	22
使用した市販標準品	カルバリル標準品 残留農薬試験用 和光純薬工業(株)社製 製品番号 148-03831 ロット番号 YPH8135
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5.2/PC (Windows) (日本バイオ・ラッドラボラトリーズ社製)
試験機関・担当者	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部 古武家善成

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

(4) 日間再現性

試験条件

本製品の日間再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.4 日間再現性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・日間再現性（標準試料試験）
対象物質	殺虫剤 カルバリル
対象製品名	カルバリル測定キット E
製品番号	ロット番号 E-CBR001F
製造年月日	-（有効期限：2006.9）
測定範囲（製品仕様）	1.5 ~ 30 µg/L
試験日時	平成 17 年 10 月 27 日 17：00～22：00 平成 17 年 10 月 31 日 9：30～16：25 平成 17 年 11 月 2 日 10：00～17：50
試験場所	兵庫県立健康環境科学研究所 センター 安全科学部
試験時室内温度	22（10/27），21±1（10/31），21（11/2）
使用した市販標準品	カルバリル標準品 残留農薬試験用 和光純薬工業(株)社製 製品番号 148-03831 ロット番号 YPH8135
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5.2/PC（Windows） （日本バイオ・ラッドラボラトリーズ社製）
試験機関・担当者	兵庫県立健康環境科学研究所 センター 安全科学部 古武家善成

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

(5) 期間再現性

試験条件

本製品の期間再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.5 期間再現性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・期間再現性（標準試料試験）
対象物質	殺虫剤 カルバリル
対象製品名	カルバリル測定キット E
製品番号	ロット番号 E-CBR001F
製造年月日	-（有効期限：2006.9）
測定範囲（製品仕様）	1.5 ~ 30 µg/L
試験日時	平成 17 年 10 月 27 日 17：00 ~ 20：00 平成 17 年 11 月 29 日 16：00 ~ 22：30
試験場所	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部
試験時室内温度	22（10/27）、22（11/29）
使用した市販標準品	カルバリル標準品 残留農薬試験用 和光純薬工業(株)社製 製品番号 148-03831 ロット番号 YPH8135
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5.2/PC（Windows） （日本バイオ・ラッドラボラトリーズ社製）
試験機関・担当者	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部 古武家善成

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

(6) プレート間再現性

試験条件

本製品のプレート間再現性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.6 プレート間再現性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・プレート間再現性（標準試料試験）
対象物質	殺虫剤 カルバリル
対象製品名	カルバリル測定キット E
製品番号	ロット番号 E-CBR001F, E-CBR002F
製造年月日	-（有効期限：2006.9）（E-CBR001F） -（有効期限：2006.10）（E-CBR002F）
測定範囲（製品仕様）	1.5 ~ 30 µg/L
試験日時	平成 17 年 11 月 1 日 13:15 ~ 21:30
試験場所	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部
試験時室内温度	21 ± 1
使用した市販標準品	カルバリル標準品 残留農薬試験用 和光純薬工業(株)社製 製品番号 148-03831 ロット番号 YPH8135
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5.2/PC (Windows) (日本バイオ・ラッドラボラトリーズ社製)
試験機関・担当者	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部 古武家善成

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

(7) 交差反応性

試験条件

本製品の交差反応性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.7 交差反応性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・交差反応性（標準試料試験）
対象物質	殺虫剤 カルバリル
対象製品名	カルバリル測定キット E
製品番号	ロット番号 E-CBR001F
製造年月日	-（有効期限：2006.9）
測定範囲（製品仕様）	1.5 ~ 30 µg/L
試験日時	平成 17 年 11 月 2 日 10:00 ~ 17:50
試験場所	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部
試験時室内温度	21
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5.2/PC（Windows） （日本バイオ・ラッドラボラトリーズ社製）
試験機関・担当者	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部 古武家善成

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	カルバリル	和光純薬工業 (株)社製	残留農薬試験用	200mg	148-03831	YPH8135
類似物質	ベンダイオカルブ	和光純薬工業 (株)社製	残留農薬試験用	200mg	028-11691	HSN9411
	フェントエート	和光純薬工業 (株)社製	残留農薬試験用	200mg	160-09133	HSN9453
	ピリプチカルブ	和光純薬工業 (株)社製	残留農薬試験用	200mg	167-16211	YPH8138

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

4.3 実用的な性能

(1) 回収特性

試験条件

本製品の回収特性における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.3.1 回収特性の試験条件

項目	内容
実証項目	実用的な性能・回収特性（模擬環境試料試験）
対象物質	殺虫剤 カルバリル
対象製品名	カルバリル測定キット E
製品番号	ロット番号 E-CBR001F
製造年月日	-（有効期限：2006.9）
測定範囲（製品仕様）	1.5 ~ 30 µg/L
試験日時	平成 17 年 11 月 21 日 10：20～21：45
試験場所	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部
試験時室内温度	20±2
使用した市販標準品	カルバリル標準品 残留農薬試験用 和光純薬工業(株)社製 製品番号 148-03831 ロット番号 YPH8135
使用した模擬環境試料	フミン酸ナトリウム アクロス社製 製品番号 120860050 ロット番号 A0207160001
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5.2/PC（Windows） （日本バイオ・ラッドラボラトリーズ社製）
試験機関・担当者	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部 古武家善成

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

(2) 測定精度等

試験条件

本製品の測定精度等における試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.3.2 測定精度等の試験条件

項目	内容
実証項目	実用的な性能・測定精度等（環境試料試験）
対象物質	殺虫剤 カルバリル
対象製品名	カルバリル測定キット E
製品番号	ロット番号 E-CBR001F
製造年月日	-（有効期限：2006.9）
測定範囲（製品仕様）	1.5 ~ 30 µg/L
試験日時	平成 17 年 12 月 14 日 10：30～22：30
試験場所	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部
試験時室内温度	19±1
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャー5.2/PC（Windows） （日本パイオ・ラッドラボラトリーズ社製）
試験機関・担当者	兵庫県立健康環境科学研究センター 安全科学部 古武家善成

表 4.3.3 使用した環境試料

試料番号	地点名	採水日	採水量	備考
S1	杉原川 春日橋	平成 17 年 12 月 7 日	1L	pH7.4 , BOD0.6mg/L
S2	美の川 美の川橋	平成 17 年 12 月 7 日	1L	pH8.4 , BOD1.6mg/L
S3	千鳥川 平安橋	平成 17 年 12 月 7 日	1L	pH7.7 , BOD0.8mg/L

試験操作

実証試験計画書に従い試験を実施した。

5. 試験結果

5.1 基本的な性能

(1) 測定範囲

検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.1 「測定範囲試験」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	
所定濃度	μg/L	0	1.5	3	15	30	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0*	1	-	1.085	0.859	0.703	0.282	0.164
	2	-	0.981	0.763	0.665	0.268	0.157
	3	-	0.934	0.783	0.615	0.273	0.158

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

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

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.00	1.27	4.33	0.107	-

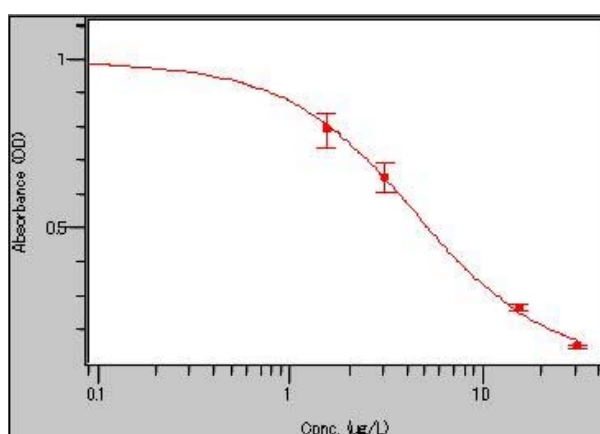


図 5.1.1 検量線

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 「測定範囲試験」対象物質試料溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液				
		溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4	
調製濃度	μg/L	1.5	3	15	30	
実測回数	回	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0*	1	-	0.751	0.592	0.240	0.135
	2	-	0.760	0.592	0.243	0.142
	3	-	0.731	0.614	0.250	0.147
	平均	-	0.747	0.600	0.244	0.142
換算値	1	μg/L	2.1	3.8	17.1	63.8
	2	μg/L	2.0	3.8	16.7	53.3
	3	μg/L	2.2	3.5	15.9	47.8
	平均	μg/L	2.09	3.68	16.6	55.0
標準偏差	μg/L	0.13	0.16	0.61	8.12	
変動係数	%	6.5	4.4	3.7	14.8	
相対値**	%	139	123	111	183	

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

** 調整濃度を 100% とした時の各実測濃度（3重測定の前平均値）との割合（%）

評価

試験用標準物質を用いて、メーカーが指定する検量線用 4 濃度系列で測定範囲を検討した結果、4 濃度系列のいずれの濃度でも変動係数は 20% 以内に入り、良好な結果が得られた。したがって、測定範囲は、メーカーの申請データどおり 1.5 ~ 30μg/L と判断される。ただし、検量線の曲線部分に当たる低濃度側および高濃度側では相対値が大きくなっており（特に、高濃度側 30μg/L では 183%）、留意する必要がある。

(2) 検出下限および定量下限

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 5.1.7 「検出下限および定量下限試験」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	
所定濃度	μg/L	0	1.5	3	15	30	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0*	1	-	1.085	0.859	0.703	0.282	0.164
	2	-	0.981	0.763	0.665	0.268	0.157
	3	-	0.934	0.783	0.615	0.273	0.158

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

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

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.00	1.27	4.33	0.107	-

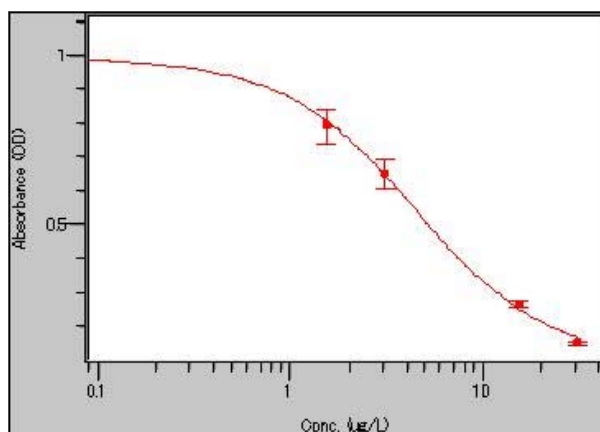


図 5.1.2 検量線

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 5.1.9 「検出下限および定量下限試験」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	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	
実測回数	回	1	2	3	4	5	6	7	8	
ELISA 実測 B/B0*	1	-	0.738	0.726	0.740	0.761	0.723	0.737	0.745	0.686
	2	-	0.771	0.728	0.741	0.743	0.742	0.702	0.746	0.702
	3	-	0.769	0.765	0.723	0.718	0.720	0.702	0.727	0.732
	平均	-	0.759	0.740	0.734	0.741	0.728	0.714	0.739	0.707
換算値	μg/L	1.97	2.15	2.20	2.14	2.26	2.40	2.16	2.47	
平均	μg/L	2.22								
標準偏差	μg/L	0.16								
変動係数	%	7.0								

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

上表の標準偏差から求めた検出下限および定量下限は、以下のとおりである。

$$\text{検出下限 (3SD : 検出下限 1)} = 0.47\mu\text{g/L}$$

$$\text{定量下限 (10SD)} = 1.6\mu\text{g/L}$$

また、濃度 0μg/L の吸光度を 10 回測定し、その標準偏差 (SD) から得られる 3SD 値 (吸光度) を濃度 0μg/L の平均吸光度から差し引いた吸光度より、検量線を用いて換算した検出下限 (検出下限 2) は、以下のとおりである。

$$\text{検出下限 2} = 1.0\mu\text{g/L}$$

評価

メーカーが申請する下限濃度 (1.5μg/L) を用いた試験結果より、標準偏差 (SD) から求めた検出下限 (3SD) および定量下限は、それぞれ 0.47μg/L および 1.6μg/L となった。また、濃度 0μg/L の吸光度から求めた検出下限は 1.0μg/L であった。この結果は、(1) で判断された測定範囲の下限 (1.5μg/L) とよく一致すると言える。

(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 5.1.10 「繰返し再現性試験」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	
所定濃度	μg/L	0	1.5	3	15	30	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0*	1	-	1.085	0.859	0.703	0.282	0.164
	2	-	0.981	0.763	0.665	0.268	0.157
	3	-	0.934	0.783	0.615	0.273	0.158

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

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

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.00	1.27	4.33	0.107	-

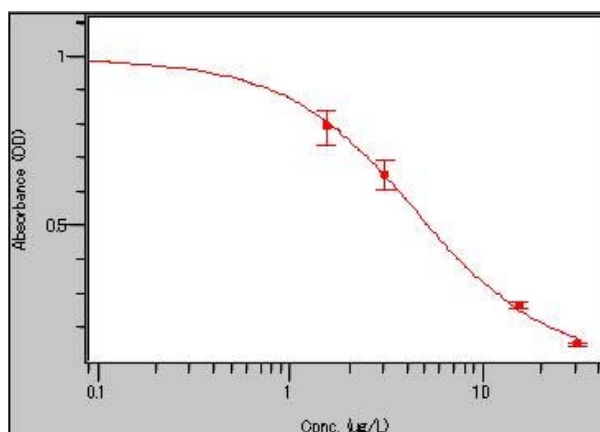


図 5.1.3 検量線

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 5.1.12 「繰返し再現性試験」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 S									
調製濃度	μg/L	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
実測回数	回	1	2	3	4	5	6	7	8		
ELISA 実測 B/B0*	吸光度	1	-	0.483	0.507	0.491	0.479	0.449	0.472	0.500	0.443
		2	-	0.491	0.510	0.505	0.491	0.496	0.487	0.489	0.484
		3	-	0.481	0.492	0.498	0.485	0.489	0.482	0.468	0.469
		平均	-	0.485	0.503	0.498	0.485	0.478	0.481	0.486	0.465
	換算値	μg/L	5.53	5.18	5.27	5.52	5.67	5.61	5.51	5.93	
平均	μg/L	5.53									
標準偏差	μg/L	0.23									
変動係数	%	4.2									

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

評価

検量線濃度系列の中間濃度に相当する濃度 5μg/L で、8 回繰返し試験を行った場合の変動係数は 4.2% となり、繰返し再現性は良好と判断される。

(4) 日間再現性

検量線作成記録

本製品における1日目の検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.13 「日間再現性試験1日目」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	
所定濃度	μg/L	0	1.5	3	15	30	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0*	1	-	1.085	0.859	0.703	0.282	0.164
	2	-	0.981	0.763	0.665	0.268	0.157
	3	-	0.934	0.783	0.615	0.273	0.158

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

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

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.00	1.27	4.33	0.107	-

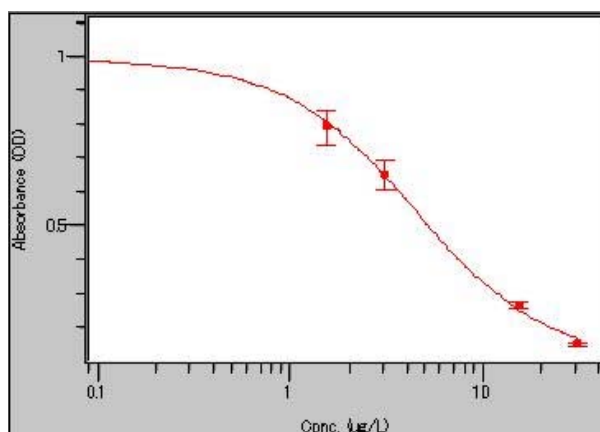


図 5.1.4 検量線

本製品における4日目の検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.15 「日間再現性試験4日目」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	
所定濃度	μg/L	0	1.5	3	15	30	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0*	1	-	1.104	0.756	0.618	0.238	0.145
	2	-	0.967	0.698	0.578	0.236	0.143
	3	-	0.929	0.693	0.565	0.239	0.144

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

表 5.1.16 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D) / (1 + (X / C)^B)$]

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.00	1.16	3.26	0.0956	-

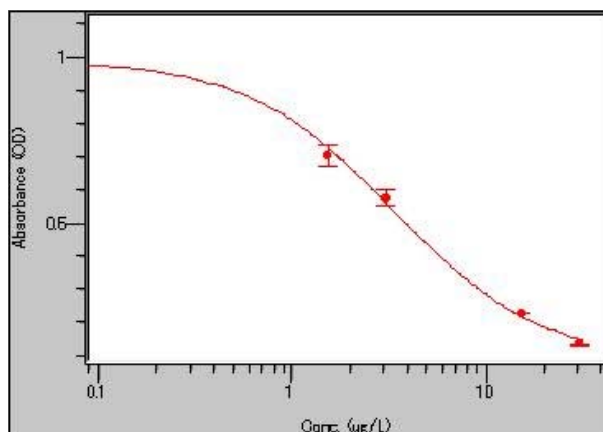


図 5.1.5 検量線

本製品における6日目の検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.17 「日間再現性試験6日目」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	
所定濃度	μg/L	0	1.5	3	15	30	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0*	1	-	1.039	0.766	0.608	0.243	0.146
	2	-	1.014	0.708	0.592	0.242	0.137
	3	-	0.947	0.708	0.588	0.242	0.137

* 添付標準 0μg/Lの平均吸光度を B0 とした。

表 5.1.18 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B$]

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.00	1.16	3.45	0.0885	-

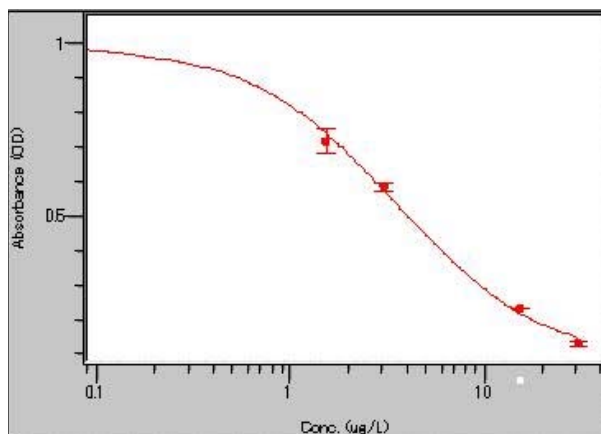


図 5.1.6 検量線

試験結果記録

本製品における対象物質の測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.19 「日間再現性試験」対象物質試料溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液													
		溶液 S1			溶液 S2			溶液 S3			溶液 S4				
		1日	4日	6日	1日	4日	6日	1日	4日	6日	1日	4日	6日		
調製濃度	μg/L	1.5	1.5	1.5	3	3	3	15	15	15	30	30	30		
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
ELISA実測 B/B0*	吸光度	1	-	0.751	0.736	0.739	0.592	0.613	0.615	0.240	0.264	0.259	0.135	0.144	0.144
		2	-	0.760	0.728	0.744	0.592	0.581	0.602	0.243	0.272	0.250	0.142	0.143	0.137
		3	-	0.731	0.700	0.711	0.614	0.593	0.608	0.250	0.264	0.247	0.147	0.143	0.140
		平均	-	0.747	0.721	0.731	0.600	0.596	0.608	0.244	0.267	0.252	0.142	0.143	0.140
換算値	μg/L	2.08	1.62	1.63	3.68	2.72	2.70	16.6	11.4	12.8	54.1	39.2	38.9		
平均	μg/L	1.78			3.03			13.6			44.1				
標準偏差	μg/L	0.27			0.56			2.66			8.69				
変動係数	%	14.9			18.4			19.6			19.7				

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

評価

同一週の3日間に測定した場合の変動係数は、調整濃度 1.5μg/L で 14.9%、3μg/L で 18.4%、15μg/L で 19.6%、30μg/L で 19.7%となり、いずれも 20%以下であった。日間再現性は概ね良好と判断される。ただし、高濃度側 30μg/L の相対値を求めると 147%と大きく、留意する必要がある。

(5) 期間再現性

検量線作成記録

本製品における最初の検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.20 「期間再現性試験最初」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	
所定濃度	μg/L	0	1.5	3	15	30	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0*	1	-	1.085	0.859	0.703	0.282	0.164
	2	-	0.981	0.763	0.665	0.268	0.157
	3	-	0.934	0.783	0.615	0.273	0.158

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

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

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.00	1.27	4.33	0.107	-

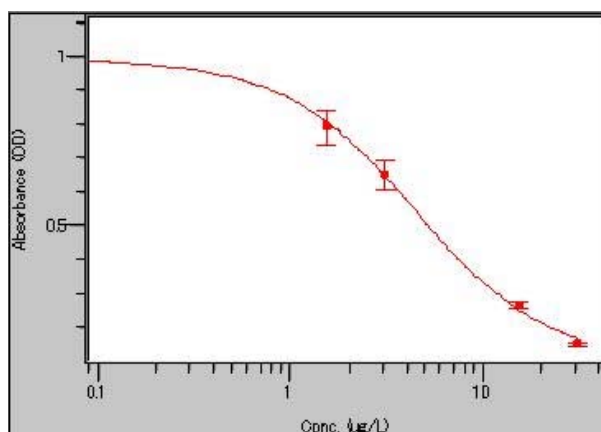


図 5.1.7 検量線

本製品における1ヶ月目の検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.22 「期間再現性試験1ヶ月目」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	
所定濃度	μg/L	0	1.5	3	15	30	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0*	1	-	1.043	0.771	0.610	0.241	0.150
	2	-	0.958	0.720	0.573	0.235	0.143
	3	-	0.998	0.718	0.581	0.232	0.141

* 添付標準 0μg/Lの平均吸光度を B0 とした。

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

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.00	1.21	3.32	0.101	-

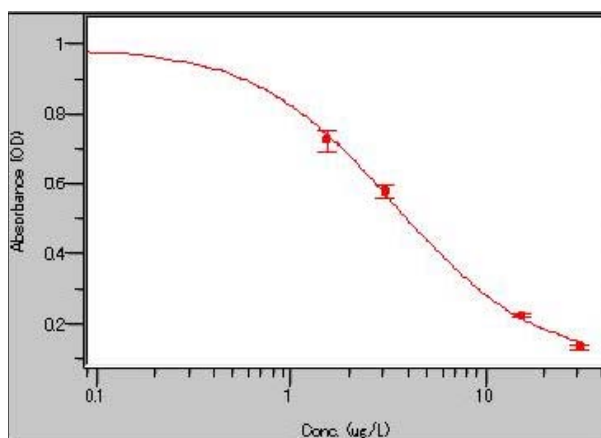


図 5.1.8 検量線

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 5.1.24 「期間再現性試験」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				
		最初	1ヶ月	最初	1ヶ月	最初	1ヶ月	最初	1ヶ月			
調製濃度	μg/L	1.5	1.5	3	3	15	15	30	30			
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	3	3			
ELISA実測 B/B0*	吸光度	1	-	0.751	0.759	0.592	0.643	0.240	0.250	0.135	0.135	
		2	-	0.760	0.748	0.592	0.596	0.243	0.242	0.142	0.135	
		3	-	0.731	0.722	0.614	0.610	0.250	0.241	0.147	0.134	
		平均	-	0.747	0.743	0.600	0.616	0.244	0.244	0.142	0.135	
	換算値	μg/L	2.08	1.56	3.68	2.60	16.6	13.1	54.1	48.4		
平均	μg/L	2.09	1.56	3.68	2.61	16.6	13.1	55.0	48.4			
標準偏差	μg/L	0.13	0.13	0.16	0.23	0.61	0.40	8.12	0.89			
変動係数	%	6.5	8.5	4.4	9.0	3.7	3.0	14.8	1.8			

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

評価

1ヶ月を隔てて2回測定した場合の変動係数は、調整濃度 1.5μg/L で 6.5% 8.5% ,3μg/L で 4.4% 9.0% ,15μg/L で 3.7% 3.0% ,30μg/L で 14.8% 1.8%となり(いずれも、矢印前は最初、後は1ヵ月後)、いずれも20%以下であった。したがって期間再現性は概ね良好と判断される。ただし、高濃度側 30μg/L の相対値を求めると 183%および 161%と大きく、留意する必要がある。

(6) プレート間再現性

検量線作成記録

本製品におけるプレート A の検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.25 「プレート間再現性試験プレートA」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	
所定濃度	μg/L	0	1.5	3	15	30	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0*	1	-	1.046	0.753	0.621	0.254	0.155
	2	-	1.029	0.716	0.612	0.252	0.148
	3	-	0.925	0.711	0.575	0.238	0.151

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

表 5.1.26 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B$]

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.00	1.17	3.42	0.101	-

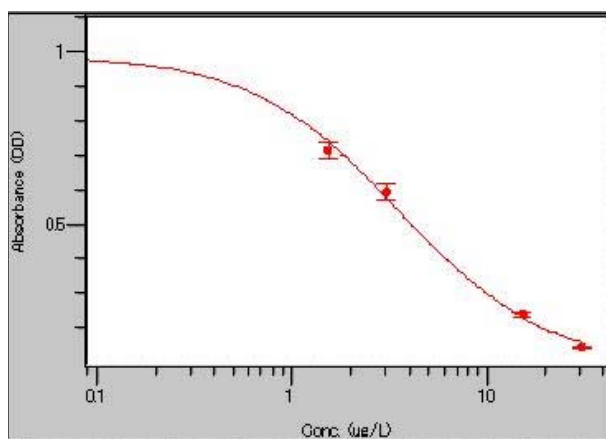


図 5.1.9 検量線

本製品におけるプレート B の検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.27 「プレート間再現性試験プレートB」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	
所定濃度	μg/L	0	1.5	3	15	30	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0*	1	-	1.052	0.782	0.599	0.243	0.144
	2	-	1.002	0.734	0.581	0.233	0.137
	3	-	0.945	0.730	0.573	0.237	0.141

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

表 5.1.28 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B$]

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.00	1.22	3.37	0.0968	-

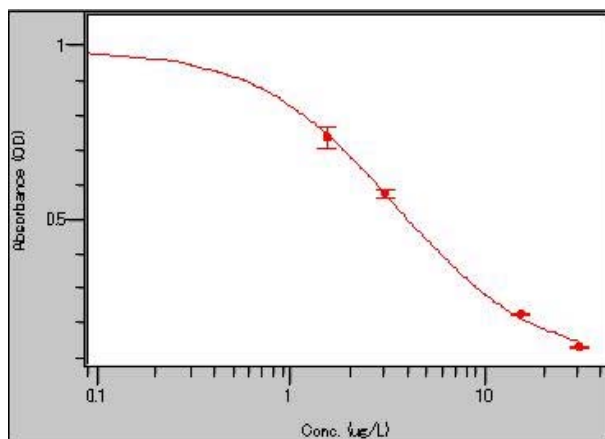


図 5.1.10 検量線

本製品におけるプレート C の検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.29 「プレート間再現性試験プレートC」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	
所定濃度	μg/L	0	1.5	3	15	30	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0*	1	-	1.046	0.766	0.632	0.248	0.166
	2	-	0.991	0.713	0.578	0.252	0.153
	3	-	0.963	0.700	0.583	0.234	0.161

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

表 5.1.30 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B$]

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.00	1.20	3.26	0.116	-

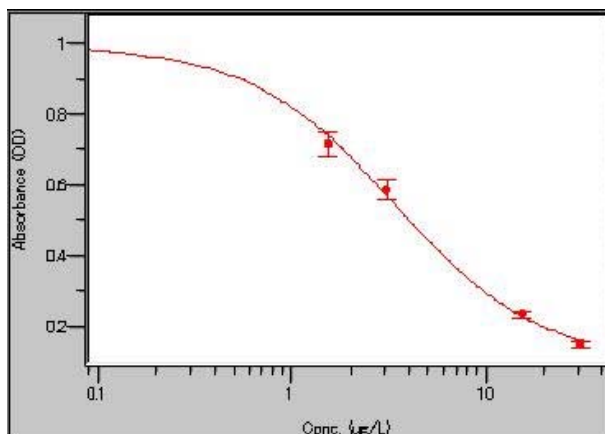


図 5.1.11 検量線

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 5.1.31 「プレート間再現性試験」対象物質試料溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液													
		溶液 S1			溶液 S2			溶液 S3			溶液 S4				
		プレート A	プレート B	プレート C	プレート A	プレート B	プレート C	プレート A	プレート B	プレート C	プレート A	プレート B	プレート C		
調製濃度	μg/L	1.5	1.5	1.5	3	3	3	15	15	15	30	30	30		
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
ELISA実測 B/B0*	吸光度	1	-	0.751	0.758	0.770	0.627	0.626	0.645	0.273	0.271	0.262	0.144	0.142	0.136
		2	-	0.754	0.743	0.694	0.624	0.623	0.597	0.266	0.258	0.248	0.143	0.143	0.138
		3	-	0.723	0.706	0.712	0.601	0.570	0.578	0.267	0.254	0.246	0.141	0.135	0.132
		平均	-	0.743	0.736	0.725	0.617	0.607	0.607	0.269	0.261	0.252	0.143	0.140	0.135
	換算値	μg/L	1.56	1.63	1.68	2.65	2.73	2.71	12.1	11.6	13.5	45.5	39.0	77.3	
平均	μg/L	1.63			2.70			12.4			53.9				
標準偏差	μg/L	0.059			0.041			0.99			20.5				
変動係数	%	3.6			1.5			8.0			38.1				

プレート A, B は同一ロット，プレート C は異ロット。

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

評価

同ロットプレート 2 枚，異ロットプレート 1 枚を用いて測定した場合の変動係数は，調整濃度 1.5μg/L で 3.6%，3μg/L で 1.5%，15μg/L で 8.0% となり，低濃度側はいずれも 20% 以下で概ね良好な結果が得られた。しかし，調整濃度が 30μg/L の場合には 38.1% となり，高濃度側でバラツキがみられる。また，相対値を求めると 179% と大きく，この点も留意する必要がある。

(7) 交差反応性

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 5.1.32 「交差反応性試験」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	
所定濃度	μg/L	0	1.5	3	15	30	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0*	1	-	1.039	0.766	0.608	0.243	0.146
	2	-	1.014	0.708	0.592	0.242	0.137
	3	-	0.947	0.708	0.588	0.242	0.137

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

表 5.1.33 採用した回帰式係数[$Y = D + (A - D)/(1 + (X / C)^B$]

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.00	1.16	3.45	0.0885	-

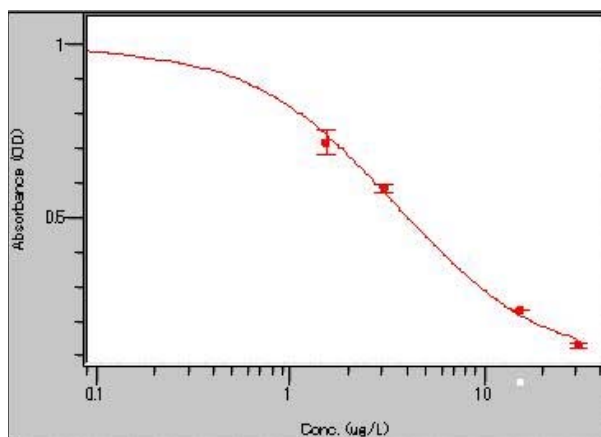


図 5.1.12 検量線

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 5.1.34 「交差反応性試験」対象物質の交差反応率

	カルバリル	ペンダイオカルブ	フェントエート	ピリプチカルブ
50%阻害濃度 ($\mu\text{g/L}$)	4.9	17	-	540
交差率(%)	100	29.5	<0.1	0.9

表 5.1.35 「交差反応性試験」対象物質試料溶液の測定データ

カルバリル		0 $\mu\text{g/L}$	1.5 $\mu\text{g/L}$	3 $\mu\text{g/L}$	15 $\mu\text{g/L}$	30 $\mu\text{g/L}$		
ELISA 実測 B/B0*	1	1.039	0.739	0.615	0.259	0.144		
	2	1.014	0.744	0.602	0.250	0.137		
	3	0.947	0.711	0.608	0.247	0.140		
平均		1.000	0.731	0.608	0.252	0.140		
標準偏差		0.048	0.018	0.0061	0.0060	0.0033		
CV (%)		4.8	2.4	1.0	2.4	2.4		
ペンダイオカルブ		0 $\mu\text{g/L}$	1.5 $\mu\text{g/L}$	3 $\mu\text{g/L}$	15 $\mu\text{g/L}$	30 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	
ELISA 実測 B/B0*	1	1.039	0.861	0.777	0.520	0.355	0.061	
	2	1.014	0.884	0.805	0.513	0.358	0.061	
	3	0.947	0.862	0.799	0.537	0.369	0.064	
平均		1.000	0.869	0.794	0.523	0.361	0.062	
標準偏差		0.048	0.013	0.015	0.012	0.0073	0.0016	
CV (%)		4.8	1.5	1.9	2.3	2.0	2.6	
フェントエート		0 $\mu\text{g/L}$	1.5 $\mu\text{g/L}$	3 $\mu\text{g/L}$	15 $\mu\text{g/L}$	30 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	3000 $\mu\text{g/L}$
ELISA 実測 B/B0*	1	1.039	0.913	0.931	0.921	0.970	0.918	0.898
	2	1.014	0.871	0.927	0.934	0.934	0.928	0.908
	3	0.947	0.931	0.909	0.886	0.904	0.881	0.897
平均		1.000	0.905	0.922	0.914	0.936	0.909	0.901
標準偏差		0.048	0.031	0.011	0.025	0.033	0.025	0.0064
CV (%)		4.8	3.4	1.2	2.7	3.5	2.8	0.7
ピリプチカルブ		0 $\mu\text{g/L}$	1.5 $\mu\text{g/L}$	3 $\mu\text{g/L}$	15 $\mu\text{g/L}$	30 $\mu\text{g/L}$	300 $\mu\text{g/L}$	3000 $\mu\text{g/L}$
ELISA 実測 B/B0*	1	1.039	0.874	0.905	0.857	0.833	0.617	0.171
	2	1.014	0.951	0.925	0.916	0.891	0.608	0.172
	3	0.947	0.889	0.875	0.862	0.863	0.615	0.171
平均		1.000	0.905	0.902	0.878	0.862	0.613	0.172
標準偏差		0.048	0.040	0.025	0.032	0.029	0.0043	0.0008
CV (%)		4.8	4.5	2.8	3.7	3.3	0.7	0.5

* 添付標準0 $\mu\text{g/L}$ の平均吸光度をB0とした。

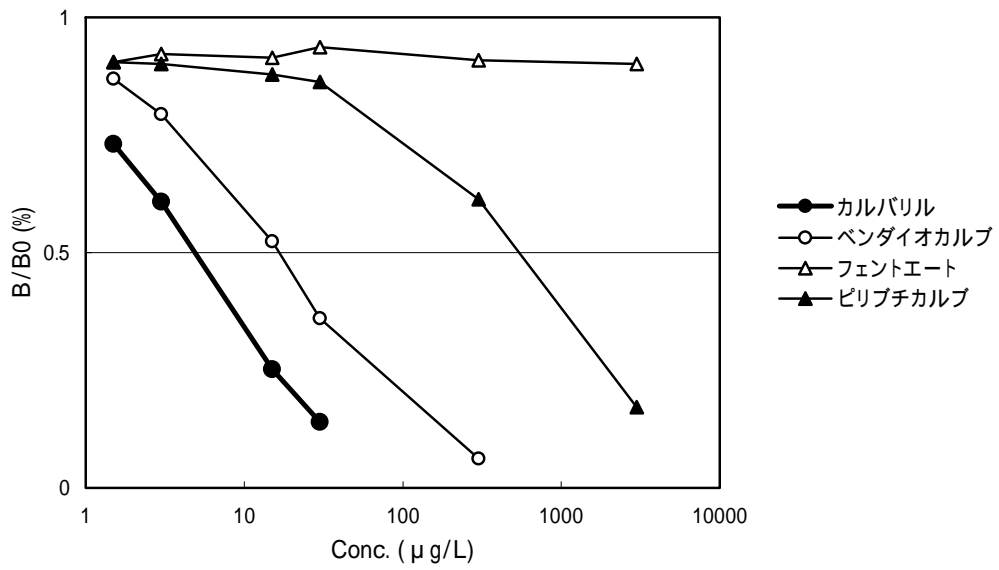


図 5.1.13 交差反応性試験結果

評価

3 類似物質の交差反応率は、ベンダイオカルブ 29.5%、フェントエート<0.1%、ピリプチカルブ 0.9%となり、メーカー申請データに含まれるベンダイオカルブとフェントエートについては、類似の結果が得られた。

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 「回収特性試験」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	
所定濃度	μg/L	0	1.5	3	15	30	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0*	1	-	1.021	0.734	0.612	0.238	0.136
	2	-	1.009	0.736	0.608	0.237	0.138
	3	-	0.970	0.689	0.578	0.235	0.138

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

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

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.00	1.17	3.45	0.0853	-

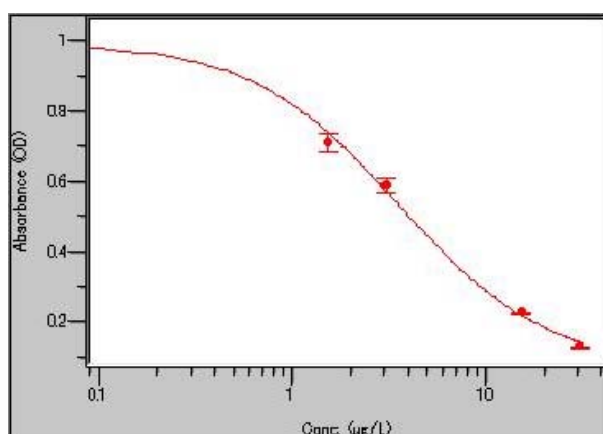


図 5.2.14 検量線

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 5.2.3 「回収特性試験」対象物質試料溶液の測定データ

項目	単位	河川ろ過水(標準 5 µg/L 添加) ³⁾					
フミン酸ナトリウム濃度 ¹⁾	mg/L	0	1	5	10	50	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0 ²⁾	1	-	0.451	0.443	0.453	0.444	0.371
	2	-	0.448	0.433	0.440	0.437	0.372
	3	-	0.450	0.458	0.464	0.431	0.381
	平均	-	0.449	0.445	0.452	0.437	0.375
換算値	1	µg/L	4.9	5.0	4.8	5.0	6.8
	2	µg/L	4.9	5.2	5.1	5.2	6.7
	3	µg/L	4.9	4.8	4.6	5.3	6.5
	平均	µg/L	4.9	5.0	4.9	5.2	6.7
標準偏差	µg/L	0.03	0.24	0.23	0.13	0.15	
変動係数	%	0.6	4.8	4.8	2.5	2.2	
回収影響率	%	98	100	97	103	133	

1) 試薬として用いたフミン酸ナトリウム(アクロス社製)の純度表示は50~60%であるので、その中間値の55%を純度として用いた。

2) 添付標準 0µg/Lの平均吸光度をB0とした。

3) 篠山川山崎橋河川水。

評 価

対象物質であるカルバリル 5µg/Lを河川ろ過水(カルバリル不検出)に添加し、一定濃度のフミン酸ナトリウム共存の影響を試験した結果、フミン酸ナトリウム 50mg/Lで多少の正の妨害が認められたが、全体として大きな影響は認められなかった。

(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 「測定精度等試験」検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	
所定濃度	μg/L	0	1.5	3	15	30	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0*	1	-	1.043	0.771	0.610	0.241	0.150
	2	-	0.958	0.720	0.573	0.235	0.143
	3	-	0.998	0.718	0.581	0.232	0.141

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

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

回帰式の係数	A	B	C	D	R ²
値	1.00	1.21	3.32	0.101	-

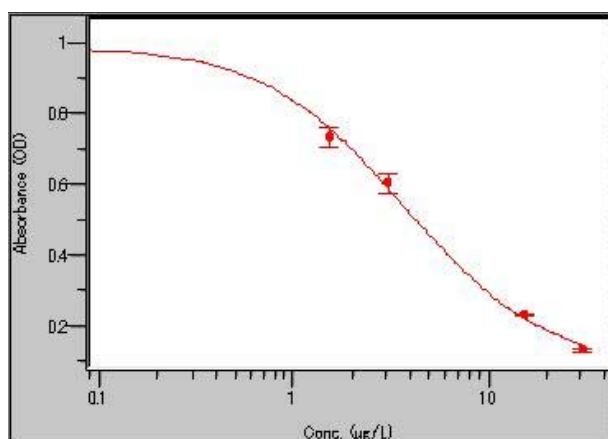


図 5.2.15 検量線

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 5.2.6 「測定精度等試験」対象物質試料溶液のELISAおよびGC/MS測定データ(標準無添加)

項目	単位	河川水(標準無添加)			
		杉原川 春日橋	千鳥川 平安橋	美の川 美の川橋	
前処理での濃縮倍率**	倍	100	100	100	
実測回数	回	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0*	1	-	0.676	0.631	0.626
	2	-	0.666	0.617	0.625
	3	-	0.697	0.632	0.607
	平均	-	0.680	0.627	0.619
ELISA 測定濃度 (換算値)	1	μg/L	0.022	0.027	0.027
	2	μg/L	0.023	0.028	0.027
	3	μg/L	0.021	0.027	0.029
	平均	μg/L	0.022	0.027	0.028
標準偏差	μg/L	0.0014	0.0008	0.0011	
変動係数	%	6.2	3.1	4.0	
GC/MS 測定濃度	μg/L	<0.002	<0.002	<0.002	

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

** 濃縮方法：コンディショニングを行った Sep-Pak PS-2 および AC-2 の連結カラムに対し、15mL/min で通水して対象物質を吸着する。ジクロロメタン 5mL で溶出、乾固後、メタノール 100μL で溶解し、精製水 900μL を加えて 1mL にした溶液を試料とした。

ELISA の検出下限は 0.47 ~ 1.0μg/L、定量下限は 1.6μg/L (無濃縮時)

ELISA の定量下限は 0.016μg/L (100 倍濃縮時)

GC/MS の定量下限は 0.002μg/L (500 倍濃縮時)

表 5.2.7 「測定精度等試験」対象物質試料溶液のELISAおよびGC/MS測定データ（標準添加）

項目	単位	河川水（標準 0.2 μg/L 添加）			
		杉原川 春日橋	千鳥川 平安橋	美の川 美の川橋	
前処理での濃縮倍率**	倍	100	100	100	
実測回数	回	3	3	3	
ELISA 実測 B/B0*	1	-	0.239	0.181	0.197
	2	-	0.252	0.166	0.228
	3	-	0.233	0.164	0.203
	平均	-	0.241	0.170	0.210
ELISA 測定濃度 (換算値)	1	μg/L	0.141	0.231	0.197
	2	μg/L	0.131	0.273	0.153
	3	μg/L	0.147	0.281	0.186
	平均	μg/L	0.140	0.262	0.179
標準偏差	μg/L	0.0085	0.0266	0.0227	
変動係数	%	6.1	10.2	12.7	
ELISA 回収率	%	70	131	90	
GC/MS 測定濃度	μg/L	0.18	0.23	0.19	
GC/MS 回収率	%	92	114	94	

* 添付標準 0μg/L の平均吸光度を B0 とした。

** 濃縮方法：コンディショニングを行った Sep-Pak PS-2 および AC-2 の連結カラムに対し、15mL/min で通水して対象物質を吸着する。ジクロロメタン 5mL で溶出、乾固後、メタノール 100μL で溶解し、精製水 900μL を加えて 1mL にした溶液を試料とした。

ELISA の検出下限は 0.47 ~ 1.0μg/L、定量下限は 1.6μg/L（無濃縮時）

ELISA の定量下限は 0.016μg/L（100 倍濃縮時）

GC/MS の定量下限は 0.002μg/L（500 倍濃縮時）

評 価

3 地点ともに原水をそのまま ELISA キットで測定して検出されず、GC/MS 分析（500 倍濃縮）でも検出されなかったことから、標準を低濃度（0.2μg/L）添加して測定を再度行った。ELISA キットに関しては、原水の 100 倍濃縮試料で、3 地点ともに微量検出される結果が得られ、濃縮によるマトリックスの影響がうかがわれた。添加試料では、変動係数、回収率ともに概ね良好な結果が得られ、GC/MS 分析結果との相関は $r=0.992$ であった。

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 項目の結果から、メーカーの申請どおり 1.5 ~ 30 μ g/L の濃度範囲において概ね妥当な製品性能の信頼性を確認した。ただし、検量線の曲線部分に当たる特に高濃度側で、実測濃度（相対値）が高めに出る傾向があり、留意する必要がある。

(2) 一般環境モニタリングでの実用性

妥当な感度、精度を有しており、前処理で適当な濃縮を行えばさらに感度の上昇が期待される。本試験の検討範囲では環境水中のマトリックスの影響は軽微と考えられることから、実用化は可能である。

(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、試料の前処理から測定結果が得られるまで 4 ~ 5 時間であり、GC/MS 分析と同等であるが、同時に約 25 試料（3 重測定）の測定が可能となる。したがって、操作の簡便性は高いと言える。取扱説明書の記述も概ね妥当である。

計 画 書

環境技術実証モデル事業
化学物質に関する簡易モニタリング技術分野

化学物質に関する簡易モニタリング技術
実証試験計画書

環境技術開発者	株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー
技術・製品の名称	技術： ELISA法（酵素免疫測定法） 製品の名称： カルバリル測定キットE

平成17年10月3日

兵庫県

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、実証機関およ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）

兵庫県立健康環境科学研究所

所長 吉村 幸男 印

（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 印

目次

1. 実証試験の概要と目的	1
1.1 実証試験の概要と目的	1
1.2 実証試験の種類	1
2. 実証試験の参加組織と実証試験参加者の責任分掌	2
2.1 実証試験の参加組織	2
2.2 実施体制	2
2.3 実証試験参加者の責任分掌	3
3. 実証試験の対象とする化学物質簡易モニタリング技術の概要	4
3.1 実証対象製品の原理	4
3.2 実証対象製品のデータ	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
検出下限および定量下限試験	11
繰返し再現性試験	12
日間再現性試験	12
期間再現性試験	12
プレート間再現性試験	12
交差反応性試験	12
(2) 実用的な性能試験	13
回収特性試験	13
測定精度試験	13
5. データの品質管理	14
6. データの管理, 分析, 表示	14
6.1 データ管理とその方法	14
6.2 データ分析と表示	14
7. 評価	14

付 録 : カルバリル物性表

付録 1 : 取扱説明書

付録 2 : 添付資料 1 - 5

1. 実証試験の概要と目的

1.1 実証試験の概要と目的

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

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

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

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

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

1.2 実証試験の種類

本実証試験では、以下の視点から実証を行うものとする。

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

2. 実証試験参加組織と実証試験参加者の責任分掌

2.1 実証試験参加組織

実証試験に参加する組織は、下表に示すとおりである。

表1 実証試験参加組織

実証機関	団体名	兵庫県立健康環境科学研究所
	住所	〒654-0037 神戸市須磨区行平町 3-1-27
	担当者所属・氏名	安全科学部 研究主幹 古武家善成
	電話番号	078-735-6911
	FAX 番号	078-735-7817
	E-mail アドレス	Yoshinari_kobuke@pref.hyogo.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。

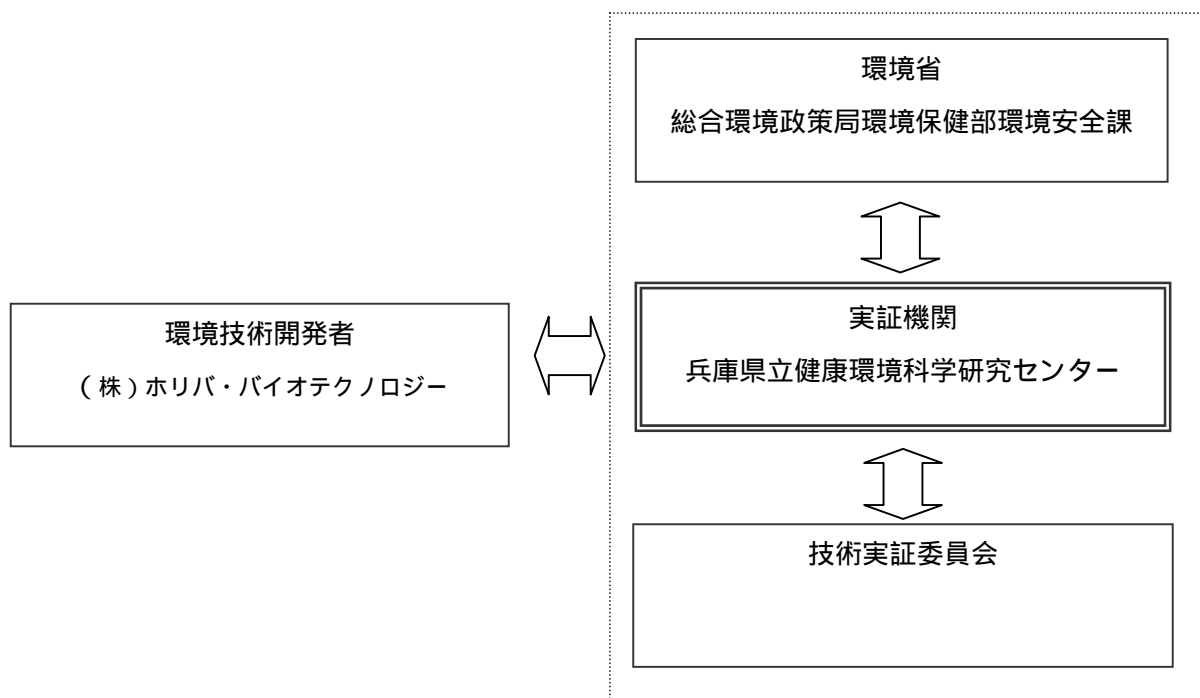


図1 実証試験の実施体制

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 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	安全科学部長	中野 武
	実証試験における ELISA 法の総括責任者	安全科学部 研究主幹	古武家 善成
	実証試験における ELISA 法担当者	安全科学部 研究員	北本 寛明
	実証試験における機器分析の総括責任者	安全科学部長	中野 武
	実証試験における機器分析担当者	安全科学部 主任研究員	松村 千里
	実証試験における機器分析担当者	安全科学部 主任研究員	吉田 光方子
	実証試験における機器分析担当者	安全科学部 主任研究員	鶴川 正寛
	実証試験における品質管理・内監の総括責任者	企画情報部長	谷本 高敏
	実証試験における品質管理・内監担当者	企画情報部 主任研究員	池沢 正
	実証試験における品質管理・内監担当者	企画情報部 課長補佐	喜多 博子
	実証試験における品質管理・内監担当者	安全科学部 主任研究員	岡田 泰史
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、申請者が開発したカルバリルに対する特異的なモノクローナル抗体を応用した、環境水等のカルバリル測定 ELISA キットである。

この ELISA キットの反応原理は競合反応（カルバリル濃度が高い試料では吸光度が低く、カルバリル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 3-1 実証対象製品のデータ 1

項目	記入欄
製品名	カルバリル測定キット E
型番	EL208-01
販売・製造元	販売・製造 : 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	カルバリル
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（調整済 / 調整要）
操作環境（室温）	室温（15～25 ）
製品保管条件	4～8
製品保証期間	製造後 12 ヶ月間
同時測定数（最多）	46 試料（2 重測定）
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	1.5 ~ 30 ppb (添付資料 1)
検出下限および定量下限	
繰返し再現性	標準偏差：0.40 ~ 1.59, 変動係数：6.9 ~ 11.4% (添付資料 2)
日間再現性	標準偏差：0.95 ~ 2.30, 変動係数：5.7 ~ 36.4% (添付資料 2)
期間再現性	保存安定性 (添付資料 3)
プレート間再現性	
交差反応性	交差率： 26.1% (ベンダイオカルブ) (添付資料 4) 2.8% (ベンフラカルブ) 2.8% (フェントエート) 2.1% (イソプルカルブ) 0.8% (フェノブカルブ)
その他	
2. 実用的な性能	
回収特性	回収率： 124.9~144.3 % (添付資料 5)
測定精度等	
その他	
試験責任者	伊東 茂壽
試験年月日	平成 15 年 12 月 27 日

【技術の先進性について】

特開 2000-191624 「カルバリルのハブテン化合物, 抗体および測定法」

【その他】

カルバリルは「PRTR 法対象物質」, 「内分泌攪乱作用の疑われる化学物質」, 「水道法水質管理目標設定項目の対象(目標値 0.05mg/L 以下)」, 「公共用水等における農薬の水質評価指針(指針値 0.05mg/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されたものです。

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 18 年 12 月とする。また、その期間のスケジュールは下表に示すとおりである。

表 4 実証試験のスケジュール（予定）

	9月	10月			11月	
	1-5週	1-2週	3週	4週	5週	1-5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			○			
検出限界および定量限界の検討			○			
繰返し再現性の検討			○			
日間再現性の検討			○			
期間再現性の検討			○			
プレート間再現性の検討			○			
交差反応性の検討				○		
回収特性の検討				○	○	
測定精度の検討				○	○	
内部監査の実施					○	
実証試験結果中間報告						○
技術実証委員会の実施						○

4.2 実証試験の内容

実証試験項目の内容は、表5のとおりである。

表5 実証項目の内容

項目	内容
1. 基本的な性能	
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検討する。
検出下限び定量下限	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 測定値の標準偏差等に基づき、数値的な設定の妥当性を検討する。
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 測定値の標準偏差等に基づき、再現性の妥当性を検討する。
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、再現性の妥当性を検討する。
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性による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を検討する。
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、再現性の妥当性を検討する。
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、交差反応性を検討する。
2. 実用的な性能	
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 測定値の比較等に基づき、回収特性を検討する。
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検討する。

4.3 実証対象製品の受け入れと管理

(1) 実証対象製品（ELISA キット）の受け入れ

ELISA キット受領時の状態について、搬入者の立ち会いの元に、受領の記録を ELISA キット管理表（様式 1）に記入し、以下の事項を確認する。

- 管理表と ELISA キットの品名、数量が一致していること。
- ELISA キットの搬送が適切に取り扱われていること。
- ELISA キットに不適合又は疑義を発見したときは、搬入者と協議し適切な処置をとる。

(2) ELISA キットの管理

- ELISA キットは、変質しないように、取扱説明書に記載された保管条件で適切に保管・管理する。
- ELISA キットの分轄を行う場合は、汚染や品質低下のない方法で行い、識別番号等必要な表示を行うとともに、分轄の年月日その他必要な事項を管理表に記録する。

ELISA キット管理表（様式1）

受領年月日 _____ 月 _____ 日 _____ 時 _____ 分 搬入者 _____

番号（管理番号） _____ - _____

メーカー名 _____ 株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー _____

品名 _____ カルバリル測定キット E _____

Lot . No. _____

搬入時確認事項

包装等に破損がない

保管場所 _____

保管温度（ _____ ）

保管温度 _____

搬入時の温度管理

使用期限

その他異常なし

受領者 _____

（移動・分轄等の記録）

4.4 実証試験の方法

基本的な性能試験および実用的な性能試験において、以下の操作は共通である。

a. 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、「化学物質簡易モニタリング実証試験 品質管理マニュアル」(付録 4) の試験操作手順(一般的な事項)に従って行う。

b. 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。

c. 吸光度の測定

指定濃度系列および各試験用試料溶液の吸光度は、マイクロプレートリーダー(バイオ・ラッド社マイクロプレートリーダー モデル 680)で測定する。

d. 検量線の作成

プレート毎に同時に測定したブランク(添付の希釈液等)およ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、キットの指示に従い検量線を作成する。

e. 実測濃度の算出

d.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

市販標準物質カルバリル標準品を用いて、メタノールを希釈溶媒として、試験用試料溶液を作成する。

標準溶液指定濃度系列および試験用試料溶液の調製濃度は、表6のとおりである。

表6 標準溶液指定系列および試験用試料溶液

試験項目	物質名	試料溶液調製濃度 (μg/L)
標準溶液指定濃度系列	キット付属 カルバリル標準 試薬	0, 1.5, 3, 15, 30
測定範囲 日間再現性 期間再現性 プレート間再現性	カルバリル	0, 1.5, 3, 15, 30
検出下限および定量下限	カルバリル	1.5
繰返し再現性	カルバリル	5
交差反応性	ベンダイオカルブ	0, 1.5, 3, 15, 30, 300
	フェントエート ピリプチカルブ	0, 1.5, 3, 15, 30, 300, 3000

測定範囲試験

市販標準物質で調製した指定濃度系列の試料溶液について、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測定濃度より、平均値、標準偏差、変動係数を求める。

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

検出下限および定量下限試験

市販標準物質で調製した指定濃度系列の下限付近の1濃度を8回測定し、3重測定の平均吸光度から算出した8個の実測濃度より標準偏差(SD)を求める。求めたSDから得られた3SDおよび10SDをそれぞれ検出下限および定量下限とし、申請データと比較検討する。

繰返し再現性試験

市販標準物質で調製した指定濃度系列の中央付近の 1 濃度を 3 重測定で 8 回測定し、3 重測定の平均吸光度から算出した 8 個の実測濃度より平均値、標準偏差、変動係数を求める。

求めた変動係数から、繰返し再現性について製品仕様の妥当性を検討する。

日間再現性試験

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

期間再現性試験

同一プレートの一部で「測定範囲試験」と同じ測定操作・検討を行う。1 ヶ月後に、冷蔵保存した残りの一部で「測定範囲試験」と同じ測定操作・検討を行う。同一プレートでこの検討ができない場合には、同一ロットの 2 プレートを用意し、1 プレートで「測定範囲試験」と同じ測定操作・検討を行った後、冷蔵保存した 1 プレートで 1 ヶ月後に「測定範囲試験」と同じ測定操作・検討を行う。各調製濃度について得られた実測濃度の平均値、標準偏差、変動係数を求め、その結果の比較から製品仕様の期間再現性の妥当性を検討する。

プレート間再現性試験

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

交差反応性試験

市販標準物質および類似物質を用いて、指定濃度系列で濃度反応曲線(吸光度は 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。(市販標準物質の 50% 阻害濃度 / 類似物質の 50% 阻害濃度) × 100 (%) で交差率を求め、類似物質の交差反応性を検討する。

類似物質に関して、指定濃度系列のみでは 50% 発色阻害濃度が求められない場合は、50% 発色阻害濃度が得られるように高濃度側を加えた濃度系列を作り、試験をやり直す。予想される高濃

度側の濃度範囲が実用的でない場合には、20 または 10% 阻害濃度で代用する。

(類似物質の交差反応性に関しては、申請者の交差反応性に関するデータを参考とする。)

(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(孔径 1 μ m に準拠)を用いて、河川水をろ過したろ液を原水とし、それに指定濃度範囲の中央付近の 1 濃度となるように市販標準物質を添加するとともに、妨害物質として標準フミン酸ナトリウム等を一定濃度添加して、試験用試料溶液を調整する。試験用試料溶液の調製濃度は、表 7 のとおりである。

調製した試験用試料溶液について、3 重測定して平均値、標準偏差、変動係数、回収率を求め、フミン酸存在下での製品の回収特性を検討する。

表 7 試験用試料溶液

物質名	試料溶液調製濃度 (mg/L)
分析対象物質：カルバリル	5
妨害物質：フミン酸ナトリウム	1
	5
	10
	50

測定精度等試験

複数(3 地点)の河川地点から得られた河川水について、キットが推奨する前処理法(取扱説明書参照)で処理しカルバリルを測定する。

合わせて同一試料について、所定のマニュアル(前処理法を含む)に従って機器分析を行なう。

得られた濃度の比較や全体的な製品の操作状況などから、下記の事項について実証対象製品の信頼性、実用性、簡便性等の観点から考察する。

- ・ 機器分析値との差による測定精度(濃度)
- ・ 試料の汚濁特性に応じた前処理妥当性(夾雑物質影響)
- ・ 全過程を通じた操作簡便性(時間、操作数)
- ・ 測定結果による環境試料への適用可能性など

5. データの品質管理

(1) 測定操作の記録

- a. 実証試験過程で入手，作成した文書（デジタル画像を含む）および記録については適切に管理・保管する。
- b. 実証項目の試験は，「品質管理マニュアル」に従って行い，その分析作業台帳および分析機器の点検事項等は，記録に残す。

(2) データ処理の管理

- a. 試験データの計算や転記について，当該実施者以外の監督者によるチェックを行い，記録を残す。
- b. 試験データのファイルはコンピュータと独立したメモリーチップに保存し，関係のない者がデータファイルにアクセスできないようにする。
- c. データファイルの紛失の可能性があるときは，バックアップを取りデータを保護する。

6. データの管理，分析，表示

6.1 データ管理

本実証試験から得られる以下のデータは，「品質管理マニュアル」に従って管理するものとする。

6.2 データ分析と表示

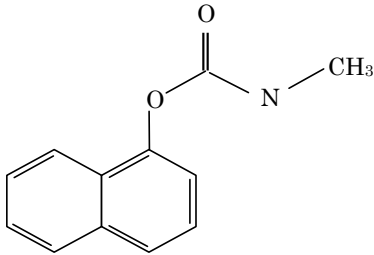
本実証試験で得られたデータについては，必要に応じ統計分析の処理を実施するとともに，使用した数式を実証試験結果報告書に記載する。

7. 評価

本実証試験で得られたデータの品質監査は，「品質管理マニュアル」に従って行うものとする。

実証試験が適切に実施されていることを確認するために実証試験の期間中に内部監査を実施し，兵庫県立健康環境科学研究所長に報告する。

カルバリル物性表

実証機関	兵庫県	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	カルバリル測定キット E			
測定対象物質名	カルバリル (Carbaryl)			
略名	NAC, Arylam, Caryderm, Clinicide			
化学名	1-Naphthalenol methylcarbamate, 1-Naphthyl methyl carbamate (IUPAC)			
分子式(分子量)	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂ (201.22)	CAS No.	63-25-2	
構造式				
物理化学的 性状	外 観	無臭、白色結晶または様々な形状の固体		
	融 点	mp 142 , bp 315 (沸点以下で分解*、**)		
	蒸気圧	< 4 × 10 ⁻⁵ mmHg (25) 0.7pa (20)		
	比 重	1.00 (20)		
	水溶解性	82.6mg/L (30)	オクタノール / 水 分配係数	Log Pow = 2.34 (1.59* , 1.59 ~ 2.3**)
	有機溶解性	DMF, アセトン, イソフォロン, シクロヘキサンに適度に溶解		
	安定性	熱, 光, 酸に安定, アルカリで加水分解		
用途	カーバメート系殺虫剤 (稲, 野菜, 果樹のウンカ, ヨコバエ, アブラムシに適用), 植物成長作用剤			
規制等	1971 年に農薬登録, IARC3, 毒劇物取締法 (劇物), 航空法 (第 9 毒物), 危規制 (第 3 条危険物告示別表第 4 毒物), 国連番号 2757 公共用水域農薬評価指針値, 水道法水質管理目標値: 0.05mg/L			
備考	<p>主要な代謝経路は環ヒドロキシル化および加水分解である。その結果, 多数の代謝産物が生成され, 水溶性の硫酸塩, グルクロニド, メルカプチュレート の構造と結合し易く, 尿中に排泄される。加水分解は, 1-ナフトール, 二酸化炭素, メチルアミンを生成する。ヒドロキシル化は, 4-ヒドロキシメチルカルバリル, 5-ヒドロキシカルバリル, N-ヒドロキシメチルカルバリル, 5-6-ジヒドロ-5-6-ジヒドロキシカルバリル, 1,4-ナフタレンジオールを生成する。ヒトにおける主要な代謝産物は 1-ナフトールである**。</p>			
*国際化学物質安全性カード (WHO/IPCS/ILO) データ, **国立医薬品食品衛生研究所データ 東京都健康安全研究センターの HP データより改図				

研究用試薬

スマートアッセイ シリーズ
カルバリル測定キットE

Ver 1

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、抗カルバリル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) によるカルバリルの測定キットです。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、環境水中のカルバリルを直接競合 ELISA 法で測定するものです。

カルバリル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、カルバリル (標準溶液または試料溶液) とカルバリル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カルバリル濃度が高いほど低下します。標準溶液のカルバリル濃度とその吸光度の関係からカルバリル濃度を求めます。

3. 測定キットの特徴

- 1) 高感度 - カルバリルを 1.5~30 ppb の範囲で測定できます。
- 2) 簡便 - 機器分析法に比べ試料の煩雑な前処理を必要とせず、簡易な操作で測定できます。
- 3) 迅速 - 前処理が簡単のため、短時間で多くの試料を同時に測定できます。
- 4) 低コスト - 高価な機器を必要とせず、測定場所を選ばないため、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
①	カルバリル抗体プレート	8 ウェル×12 列 (96 ウェル)	乾燥品	1 枚
②	カルバリル標準試薬 C1 (1.5 ppb)	1 mL	凍結乾燥品	2 バイアル
③	カルバリル標準試薬 C2 (3 ppb)	1 mL	凍結乾燥品	2 バイアル
④	カルバリル標準試薬 C3 (15 ppb)	1 mL	凍結乾燥品	2 バイアル
⑤	カルバリル標準試薬 C4 (30 ppb)	1 mL	凍結乾燥品	2 バイアル
⑥	カルバリル酵素標識物試薬	6 mL	凍結乾燥品	2 バイアル
⑦	洗浄試薬 (10 倍濃縮)	50 mL	液状品	1 バイアル
⑧	発色試薬	13 mL	液状品	1 バイアル
⑨	発色停止試薬	13 mL	液状品	1 バイアル
⑩	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カルバリル測定キットE：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
- ④10%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. 溶液の調製

- (1) カルバリル抗体プレート
そのまま用います。
- (2) カルバリル標準溶液
カルバリル標準試薬 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、それぞれカルバリル標準溶液 C1 から C4 とします。溶解後の濃度は、それぞれ 1.5、3、15 および 30 ppb です。
- (3) カルバリル酵素標識物溶液
酵素標識物試薬に精製水 6 mL を加えて溶解し、カルバリル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% 溶液に調製し、試料溶液とします。

混合液の調製

カルバリル標準溶液または試料溶液 150 μ L をマイクロピペットで試験管に取り、それぞれにカルバリル酵素標識物溶液 150 μ L 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 μ L 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 $^{\circ}$ 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、洗浄溶液 300 μ L 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

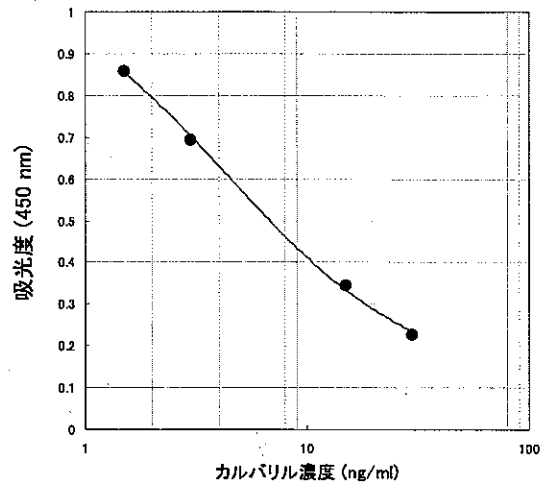
マイクロピペットで発色試薬 100 μ L を加えて室温 (15~25 $^{\circ}$ C) で 10 分間反応させた後、発色停止試薬 100 μ L をマイクロピペットで添加して下さい。
*発色試薬を加えると時間と共に青色に、発色停止試薬を加えると瞬時に黄色に呈色します。
*各ウェルの発色反応時間が一定になるように注意して下さい。

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。
*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。
*“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) 試料中のカルバリル濃度の計算

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カルバリル濃度 (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。



$$Y = 0.11 + (1.11 - 0.11) / (1 + 10^{(\log X - \log 4.4)})$$

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 (%)
カルバリル	デナボン、ナック	100
ベンダイオカルブ	タト	26.1
ベンフラカルブ	オンコル	2.8
イソプロカルブ	ミブシン	2.1
フェノプロカルブ	パッサ	0.8
フェントエート	エルサン	2.8
フェニトロチオン	スミチオン	<0.1
アセフェート	オルトラン	<0.1
マラチオン	マラソン	<0.1
フルバリネート	マブリック	<0.1
シクロプロトリン	シクロサル	<0.1
IBP	キタジnP	<0.1

9. 貯法・有効期間

貯法 : 遮光して 2~8 $^{\circ}$ C に保存します。

有効期間 : パッケージの外面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

- ① 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。
- 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ください。
- ③ 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。

- ④ 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。カルバリルを含む廃液、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。
- ⑤ 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

- ① 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。
- ② 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。
- ③ 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。
- ④ 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。
- ⑤ 検量線は、測定ごとに作成してください。
- ⑥ 測定は少なくとも 2 重測定で行ってください。
- ⑦ 測定は、検量線範囲内の濃度（1.5～30 ppb）で行って下さい。30 ppb 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。
- ⑧ 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。
- ⑨ 本キットは、ペンダイオカルブと 26.1%の交差反応性がありますのでご注意ください。

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>

資料 1 - 1

測定範囲の設定 (カルバリル)

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10倍ずつ順次希釈し、10ppmの検量線用標準液を調製した。

↓
検量線用標準液を表に示すように希釈列を調製した。

検量線溶液の調製

	1	2	3	4	5	6
検量線用標準液 (ppm)	10	2.5	0.63	0.16	0.04	0
希釈後 (ppb)	100	25.0	6.3	1.6	0.4	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40μL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100μL/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100μL/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100μL/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1.5 ppb、及びB/Bo=0.2付近の濃度 (測定上限; H)
として30ppbを選定して、測定範囲上限および下限と設定した。

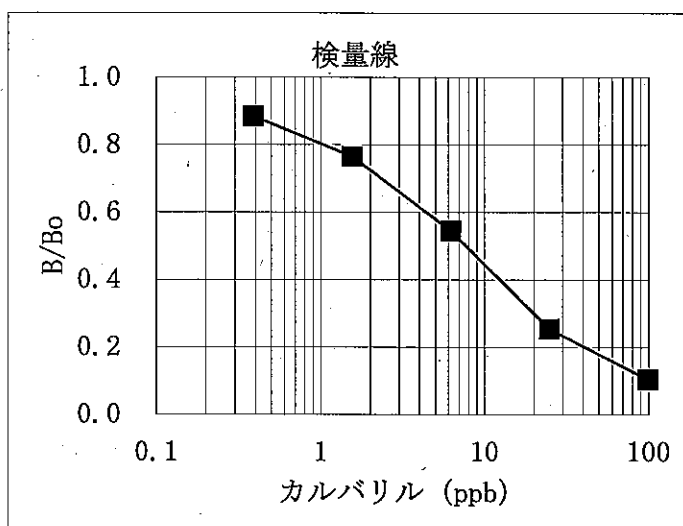


図1. カルバリル検量線 (B/Bo表示)

測定範囲の設定 (カルバリル)

2. 有意差検定

2-1. 目的

設定した測定範囲の下限値 (1.5 ppb) と上限値 (30 ppb) の B_0 及び試薬ブランクに対する有意差を確認する。

2-2. 材料

カルバリル測定キット

2-3. 方法

2-3-1. キットの調製

4°C保存キットを30分間25°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。
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 μ L/well分注した。

↓
25°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°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

2-3-3. 検定方法

B_0 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	1.024875	0.899625
分散	0.00191413	0.00122227
観測数	8	8
プールされた分散	0.0015682	
仮説平均との差異	0	
自由度	14	
t	6.3256841	
P(T<=t) 片側	9.3648E-06	
t 境界値 片側	1.76130925	
P(T<=t) 両側	1.873E-05	
t 境界値 両側	2.1447886	

表1-2.

Hと試薬ブランクとの間の有意差検定

	H	試薬ブランク
平均	0.261375	0.03525
分散	0.00014255	0.000143357
観測数	8	8
プールされた分散	0.00014296	
仮説平均との差異	0	
自由度	14	
t	37.8249496	
P(T<=t) 片側	8.44E-16	
t 境界値 片側	1.76130925	
P(T<=t) 両側	1.688E-15	
t 境界値 両側	2.1447886	

BoとLの t 検定結果

t > t 境界値片側 であり、BoとLの間には有意差が認められた。

Hと試薬ブランクの t 検定結果

t > t 境界値片側 であり、Hと試薬ブランク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 (カルバリル)

1. 目的
キットの再現性 (同時、日間) を確認する。

2. 材料
カルバリル測定キット
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
↓
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)	15.00	10.00	3.00

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
	ppm	ppm	ppb	mL
A	15.00	0.75	14.71	0.25
B	10.00	0.50	9.80	0.25
C	3.00	0.15	2.94	0.25

↓
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をバイアル瓶にとり、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 $^{\circ}$ 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

3-5. 同時再現性

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

3-6. 日間再現性

同一測定者が日を変えて3回行った。(8重測定)

4. 結果

表2-1. 同時再現性

	測定値 (ppb)		
	試料 A	試料 B	試料 C
1	21.51	13.99	3.64
2	22.52	16.15	3.56
3	20.73	17.47	3.38
4	22.94	16.68	3.31
5	23.48	16.83	3.42
6	25.28	17.79	4.26
7	24.37	19.25	3.94
8	21.41	15.35	2.95
平均	22.78	16.69	3.56
標準偏差	1.56	1.59	0.40
変動係数(%)	6.9	9.5	11.4

表2-2. 日間再現性

	測定値 (ppb)		
	試料 A	試料 B	試料 C
1日目	20.46	12.12	1.67
2日目	22.42	13.97	2.57
3日目	22.78	16.69	3.56
平均	21.89	14.26	2.60
標準偏差	1.25	2.30	0.95
変動係数(%)	5.7	16.1	36.4

5. 考察

ほうれんそうのホモジネートにカルバリルを添加した3試料を用いて、同時再現性および日間再現性を検討した。結果は、それぞれ表2-1及び2-2に示す通りで、変動係数が各々6.9~11.4及び5.7~36.4%であり、低濃度試料の測定において、測定値の変動が見られた。

資料3

保存安定性試験 (カルバリル)

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

カルバリル測定キット：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 酵素標識物の保存安定性試験 (1ロット目)

		保存日数					
		0	28	90	180	270	330
Bo	吸光度	0.993	0.984	0.884	0.987	0.942	0.883
	SD	0.070	0.023	0.022	0.056	0.020	0.019
	CV (%)	7.1	2.3	2.5	5.7	2.1	2.1
	相対値 [※]	100.0%	99.1%	89.0%	99.4%	94.8%	88.9%
Boコントロール	吸光度	0.730	1.102	0.878	1.021	1.171	1.079
	SD	0.025	0.031	0.045	0.039	0.040	0.023
	CV (%)	3.4	2.8	5.1	3.8	3.4	2.2
	相対値 [※]	100.0%	151.1%	120.3%	140.0%	160.5%	147.8%

表3-2 標準品の保存安定性試験 (1ロット目)

		保存日数				
		0	28	60	90	180
Boコントロール	吸光度	1.722	1.836	1.598	2.050	1.811
	SD	0.070	0.035	0.021	0.072	0.034
	CV (%)	4.1	1.9	1.3	3.5	1.9
	相対値 [※]	100.0%	106.6%	92.8%	119.1%	105.2%
標準品L	吸光度	1.348	1.487	1.309	1.535	1.539
	B/Bo	0.783	0.810	0.819	0.749	0.850
	SD	0.048	0.029	0.048	0.067	0.013
	CV (%)	3.6	1.9	3.7	4.3	0.8
標準品H	吸光度	0.382	0.473	0.432	0.516	0.472
	B/Bo	0.222	0.257	0.270	0.252	0.261
	SD	0.014	0.007	0.014	0.031	0.029
	CV (%)	3.5	1.4	3.2	6.0	6.1
	相対値 ^{※※}	100.0%	123.6%	113.1%	134.9%	123.5%

※ 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

4-2.2ロット目

表3-3 標準品の保存安定性試験 (2ロット目)

		保存日数					
		0	28	90	180	270	330
Bo	吸光度	1.005	0.977	0.887	0.970	0.994	0.859
	SD	0.077	0.025	0.040	0.035	0.035	0.035
	CV(%)	7.6	2.5	4.5	3.7	3.6	4.1
	相対値 [*]	100.0%	97.3%	88.3%	96.5%	98.9%	85.5%
Boコントロール	吸光度	1.085	1.148	0.988	1.136	1.193	1.098
	SD	0.023	0.027	0.038	0.019	0.048	0.034
	CV(%)	2.1	2.3	3.9	1.7	4.1	3.1
	相対値 [*]	100.0%	105.8%	91.1%	104.6%	109.9%	101.1%

表3-3 標準品の保存安定性試験 (2ロット目)

		保存日数				
		0	28	60	90	180
Boコントロール	吸光度	1.832	1.786	1.705	1.786	1.545
	SD	0.033	0.031	0.030	0.049	0.057
	CV(%)	1.8	1.8	1.8	2.7	3.7
	相対値 [*]	100.0%	97.5%	93.0%	97.5%	84.3%
標準品L	吸光度	1.400	1.483	1.424	1.443	1.347
	B/Bo	0.764	0.830	0.836	0.808	0.872
	SD	0.069	0.085	0.025	0.042	0.017
	CV(%)	5.0	5.7	1.7	2.9	1.3
標準品H	吸光度	0.365	0.407	0.392	0.393	0.395
	B/Bo	0.199	0.228	0.230	0.220	0.256
	SD	0.016	0.017	0.010	0.009	0.019
	CV(%)	4.3	4.1	2.6	2.3	4.7
	相対値 ^{**}	100.0%	111.7%	107.3%	107.7%	108.3%

^{*} 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℃180日保存で相対値の変動が20%以内であるので、本キットは5ヶ月使用可能である。

交差反応性 (カルバリル)

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

カルバリル測定キット (標準試薬は除く)

対象農薬の標準品

1	カルバリル
2	ベンダイオカルブ
3	ベンフラカルブ
4	フェントエート
5	イソプロカルブ
6	フェノブカルブ
7	フェニトロチオン
8	アセフェート
9	マラチオン
10	フルバリネート
11	シクロプロトリン
12	イプロベンフォス

3. 方法

3-1. 交差反応性測定用試液の調製

標準品をメタノールで溶解して段階希釈し希釈列を調製した。

試験管に4mLの10%メタノールをとり、希釈列を各試験管に40 μ l添加して、交差反応性測定用試液とした。

3-2. キットの調製

4 $^{\circ}$ C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 (カルバリル) / IC₅₀値 (対象農薬) × 100

4. 結果

表4 交差反応性一覧

農薬	交差反応性(%)
カルバリル	100
ベンダイオカルブ	26.1
ベンフラカルブ	2.8
フェントエート	2.8
イソプロカルブ	2.1
フェノブカルブ	0.8
フェニトロチオン	<0.1
アセフェート	<0.1
マラチオン	<0.1
フルバリネート	<0.1
シクロプロトリン	<0.1
イプロベンフォス	<0.1

5. 考察

各種農薬に対する本キットの交差反応性は、表4に示す通りで、ベンダイオカルブに26.1%、ベンフラカルブに2.8%、フェントエートに2.8%、イソプロカルブに2.1%、フェノブカルブに0.8%の交差反応性を示した。その他の対象農薬に交差反応性は認められなかった。

添加回収試験 (カルバリル)

1. 目的

農産物に添加したカルバリルの回収率を確認する。

2. 材料

カルバリル測定キット

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

↓
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)	15.00	10.00	3.00

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
	ppm	ppm	ppb	mL
A	15.00	0.75	14.71	0.25
B	10.00	0.50	9.80	0.25
C	3.00	0.15	2.94	0.25

↓
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をバイアル瓶にとり、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°C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°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。
標準試薬に10%メタノール 1.0mLを添加、溶解して標準試液とした。

3-4. アッセイ

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

↓
各混合試液を抗体プレートに100 μL/well分注した。

↓
25℃ 1時間静置した。

↓
吸引、洗浄3回実施した。
発色液を100 μL/well分注した。

↓
発色反応 25℃ 10分間静置した。

↓
反応停止
反応停止液100 μL/well分注した。

↓
測定 (450nm)

測定機：スマートリーダー

4. 結果

表5 添加回収試験

添加濃度 (ppm)	回収濃度 (ppm)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
0.75	1.00	135	142.5 ± 7.4
	1.10	142	
	1.10	150	
0.50	0.59	119	144.3 ± 22.8
	0.81	163	
	0.75	151	
0.15	0.15	98	124.9 ± 23.9
	0.20	135	
	0.21	141	

5. 考察

ほうれんそうのホモジネートにカルバリルを添加した試料について、添加回収試験を行った。結果は表5のとおり、回収率は124.9~144.3%と添加濃度よりも高めに測定された。なお、回収率の計算は、下記のとおりである。

回収率 (%) = (添加試料の回収濃度) / (添加濃度) × 100