

(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

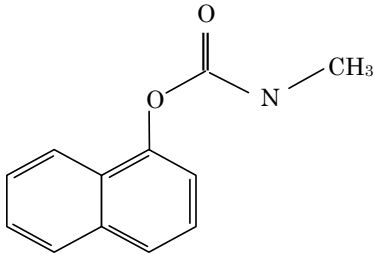
本実証試験で得られたデータについては，必要に応じ統計分析の処理を実施するとともに，使用した数式を実証試験結果報告書に記載する。

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。

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

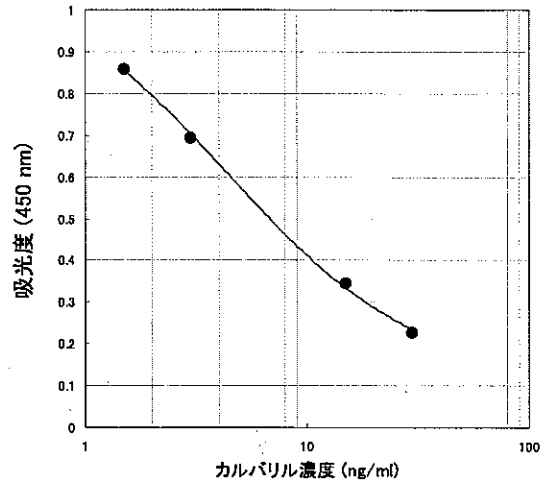
マイクロピペットで発色試薬 100 μ L を加えて室温 (15~25 $^{\circ}$ C) で 10 分間反応させた後、発色停止試薬 100 μ L をマイクロピペットで添加して下さい。
*発色試薬を加えると時間と共に青色に、発色停止試薬を加えると瞬時に黄色に呈色します。
*各ウェルの発色反応時間が一定になるように注意して下さい。

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 | マプリック | <0.1 |
| シクロプロトリン | シクロサル | <0.1 |
| IBP | キタジンP | <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。

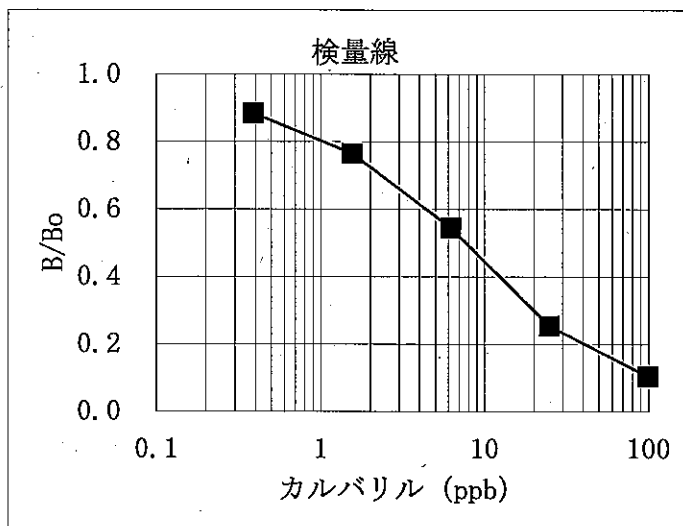


図1. カルバリル検量線 (B/Bo表示)

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

カルバリル測定キット

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 | 1.024875 | 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。

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