

環境技術実証モデル事業

化学物質に関する簡易モニタリング技術分野

化学物質に関する簡易モニタリング技術 実証試験結果報告書

環境技術開発者	日本エンバイロケミカルズ株式会社
技術・製品の名称	《技術名》ELISA法（酵素免疫測定法） 《製品名》グリホサートELISAキット

平成18年3月

山 口 県

はじめに

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

本実証試験は、平成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、その結果を取りまとめたものである。

(実証機関)

山口県環境保健研究センター

所 長 宮村 恵宣

(要 約)

製品名称	グリホサート ELISA キット
環境技術開発者	日本エンバイロケミカルズ(株)
実証機関	山口県
対象物質	グリホサート
実証試験の実施期間	平成 17 年 10 月 25 日～平成 18 年 2 月 3 日

1. 実証対象技術の概要

この実証対象製品は、グリホサートに対する特異的な抗体を応用した、環境中（対象環境媒体：水質、底質、生物）のグリホサート ELISA キットである。

ELISA の原理は、競合反応（グリホサート濃度が高い試料では吸光度が低く、グリホサート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	内容
製品名	グリホサート ELISA キット
型番	製造元コード：PN500086
販売・製造元	販売：和光純薬工業(株) 輸入：日本エンバイロケミカルズ(株) 製造：Abraxis LLC (米国)
重量 (g)	845g
価格 (円)	要照会
分析対象物質	グリホサート
対象環境媒体	水質・底質・生物 水試料以外は抽出操作が必要
利用用途	環境水のモニタリング
標準試薬・種類	付属 (調製済)
操作環境 (室温)	10 ~ 30
製品保管条件	2 ~ 8
製品保証期間	製造後 12 ヶ月間
同時測定数	43 試料 (n=2 で 1 キット使用時)
測定時間	2 時間 (固相抽出等の前処理時間を除く)

4. 実証試験結果の概要

項目	結果概要	
実証機関	山口県	
製品名称	グリホサート ELISA キット	
環境技術開発者	日本エンバイロケミカルズ(株)	
対象物質	グリホサート	
実証試験計画書の策定	平成 17 年 10 月	
実証試験の実施期間	平成 17 年 10 月 25 日 ~ 平成 18 年 2 月 3 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 0.15 ~ 5 µg/L での 相対値: 124.0 ~ 139.9 % 変動係数: 1.4 ~ 15.4 %	0.15 ~ 5 µg/L
検出下限 及び定量下限	調製濃度 0.15 µg/L の SD から求めた 検出下限(3SD): 0.138 µg/L 定量下限(10SD): 0.459 µg/L 0 濃度から求めた検出下限: 0.122 µg/L	検出限界: 0.1 µg/L 定量下限: 0.15 µg/L
繰返し再現性	調製濃度 1 µg/L での測定値 標準偏差: 0.106 µg/L 変動係数: 9.0%	標準偏差: 0.151 µg/L 変動係数: 10.9%
日間再現性	調製濃度 0.15 ~ 5 µg/L での測定値 標準偏差: 0.021 ~ 0.461 µg/L 変動係数: 3.5 ~ 11.3%	標準偏差: 0.063 µg/L 変動係数: 8.2%
期間再現性	調製濃度 0.15 ~ 5 µg/L での変動係数 1 回目: 1.4 ~ 15.4 % 2 回目(一カ月後): 2.4 ~ 8.5 %	標準偏差: 0.091 µg/L 変動係数: 11.8%
プレート間再現性	調製濃度 0.15 ~ 5 µg/L での測定値 標準偏差: 0.006 ~ 0.863 µg/L 変動係数: 2.8 ~ 13.0%	標準偏差: 0.33 µg/L 変動係数: 11.7%
交差反応性	Glyphosine 0.491 % Glufosinate ammonium 0.001% 未満 AMPA 0.013 %	阻害率 50% B/B ₀ 濃度: Glyphosine 3,000 µg/L Glufosinate 70,000 µg/L AMPA >1,000,000 µg/L
2) 実用的な性能		
回収特性	グリホサートを添加(1 µg/L)した河川水に、フミン酸ナトリウムを添加(1, 5, 10, 50mg/L)した試料の回収率(添加 0 を 100 として): 各々 98, 112, 115, 167%	環境水への添加回収実験: 平均回収率 104%
測定精度等	・河川水を直接測定: ELISA 法では不検出。 ・河川水に 0.15 µg/L, 0.5 µg/L, 1 µg/L, 5 µg/L 相当添加したときの ELISA 法回収率: 161%、116%、127%、123%	機器分析(ポストカラム誘導体化 HPLC 法)との比較: R=0.895
結果の検討と考察		
<p>1) 製品性能の信頼性: 実証試験で実施した基本性能 7 項目の全ての結果から、0.15 ~ 5 µg/L の濃度範囲においていずれの場合も測定値の方が調整濃度より高めの傾向があったが、ほぼ妥当な製品性能の信頼性を確認した。</p> <p>2) 一般環境モニタリングでの実用性: 環境試料として河川水にグリホサートを添加した実証試験結果から 0.5 µg/L 以上の濃度であれば、水質モニタリング等での実用化が可能である。</p> <p>3) 製品操作等の簡便性: 一般環境モニタリングでの使用を想定した場合、誘導体化の操作を含め、約 3 時間で測定結果が得られた。また、同時に約 2.5 試料(3 重測定)の測定が可能である。 なお、本試験での蛍光誘導体化・HPLC 法では、3 試料(3 重測定)の測定に約 1 日が必要である。</p>		

(本 編)

目 次

1. 実証試験の概要	1
1.1 実証対象製品のデータ	1
1.2 実証試験結果	2
(1) 基本的な性能	2
(2) 実用的な性能	3
2. 実証対象技術及び実証対象製品の特性と説明	4
2.1 実証申請者	4
2.2 実証対象技術の原理	4
2.3 実証対象製品のデータ（性能、製品製造者、製品番号等）	4
3. 実証試験実施体制	5
3.1 実証試験申請者	5
3.2 実証試験実施者	5
3.3 実証試験実施場所	5
(1) E L I S A 法	5
(2) 機器分析法	5
3.4 実証試験実施期間	5
4. 試験方法	6
4.1 共通して行う試験操作	6
(1) 製品の操作	6
(2) 検量線作成用標準溶液の調製	6
(3) 吸光度の測定	6
(4) 検量線の作成	6
(5) 実測濃度の算出	6
4.2 基本的な性能	7
(1) 測定範囲	7
(2) 検出下限及び定量下限（検出下限 1）	8
(3) 検出下限及び定量下限（検出下限 2）	9
(4) 繰返し再現性	10
(5) 日間再現性	11
(6) 期間再現性	12
(7) プレート間再現性	13
(8) 交差反応性	14
4.3 実用的な性能	15
(1) 回収特性	15
(2) 測定精度等	16

5. 試験結果	18
5.1 基本的な性能	18
(1) 測定範囲	18
(2) 検出下限及び定量下限（検出下限1）	20
(3) 検出下限及び定量下限（検出下限2）	22
(4) 繰返し再現性	23
(5) 日間再現性	25
(6) 期間再現性	27
(7) プレート間再現性	29
(8) 交差反応性	32
5.2 実用的な性能	36
(1) 回収特性	36
(2) 測定精度等	38
6. 実証試験結果の検討と考察	42
(1) 製品性能の信頼性	42
(2) 一般環境モニタリングでの実用性	42
(3) 製品操作等の簡便性	42

付録： 実証試験計画書

1. 実証試験の概要

1.1 実証対象製品の概要

表 1.1 実証対象製品のデータ

項目	内容
技術・製品の名称	グリホサート ELISA キット
実証申請者	日本エンバイロケミカルズ株式会社 代表取締役社長 小林 厚夫
実証試験実施者	山口県環境保健研究センター 所長 宮村 恵宣
実証試験実施場所	〒753-0821 山口市葵 2 丁目 5-67 山口県環境保健研究センター 薬庁舎 (ELISA 法) 〒753-0871 山口市朝田 535 山口県環境保健研究センター 大歳庁舎 (機器分析法)
実証試験実施期間	平成 17 年 10 月 25 日 ~ 平成 17 年 12 月 2 日
製品名	グリホサート ELISA キット
型番	製造元コード : PN500086
販売・製造元	販売 : 和光純薬工業 (株) 輸入 : 日本エンバイロケミカルズ (株) 製造 : Abraxis LLC (米国)
重量 (g)	845g
価格 (円)	要照会
分析対象物質	グリホサート
対象環境媒体	水質・底質・生物 水試料以外は抽出操作が必要
利用用途	環境水のモニタリング
標準試薬・種類	付属 (調製済)
操作環境 (室温)	10 ~ 30
製品保管条件	2 ~ 8
製品保証期間	製造後 12 ヶ月間
同時測定数	43 試料 (n=2 で 1 キット使用時)
測定時間	2 時間 (固相抽出等の前処理時間を除く)

1.2 実証試験結果

(1) 基本的な性能

測定範囲

製品の測定範囲に調製した試験用試料溶液 (0.15, 0.5, 1, 5 $\mu\text{g/L}$) を測定した実測値の相対値は、124.0 ~ 139.9%、変動係数は、1.4% ~ 15.4%であった。

(製品のデータ : 0.15 ~ 5 $\mu\text{g/L}$)

検出下限及び定量下限

製品の測定下限付近 (0.15 $\mu\text{g/L}$) に調製した試験用試料溶液を繰返し測定 (3 重測定 8 回) した実測値 (濃度) の標準偏差 (SD) から求めた検出下限 (3SD) は、0.138 $\mu\text{g/L}$ 、定量下限 (10SD) は、0.459 $\mu\text{g/L}$ であった。

0 濃度で吸光度を 10 回測定して標準偏差 (SD) を求め、平均吸光度から 3SD を差し引いた吸光度に相当する濃度を検出下限とすると、検出下限は 0.122 $\mu\text{g/L}$ であった。

(製品のデータ : 検出限界は 0.1 $\mu\text{g/L}$ 、定量下限は 0.15 $\mu\text{g/L}$)

繰返し再現性

製品の測定範囲の中央付近 (1 $\mu\text{g/L}$) に調製した試験用試料溶液を繰返し (3 重測定で 8 回測定) 測定した実測値 (濃度) の変動係数は、9.0% (標準偏差 0.106 $\mu\text{g/L}$) であった。

(製品のデータ : 変動係数 10.9%、標準偏差 0.151 $\mu\text{g/L}$)

日間再現性

製品の測定範囲 (0.15 ~ 5 $\mu\text{g/L}$) に調製した試験用試料溶液を、連続した 3 日間測定した実測値 (3 重測定、濃度) の変動係数は、調製濃度 0.15 $\mu\text{g/L}$ のとき 11.3% (標準偏差 0.025 $\mu\text{g/L}$)、調製濃度 0.5 $\mu\text{g/L}$ のとき 3.5% (標準偏差 0.021 $\mu\text{g/L}$)、調製濃度 1 $\mu\text{g/L}$ のとき 6.9% (標準偏差 0.090 $\mu\text{g/L}$)、調製濃度 5 $\mu\text{g/L}$ のとき 7.1% (標準偏差 0.461 $\mu\text{g/L}$) であった。

(製品のデータ : 変動係数 8.2%、標準偏差 0.063 $\mu\text{g/L}$)

期間再現性

製品の測定範囲 (0.15 ~ 5 $\mu\text{g/L}$) に調製した試験用試料溶液を、同一ロットのプレートを用い、1 ヶ月の期間を隔てて 2 回測定した。各試料溶液について 3 重測定を行った各 OD 値からそれぞれ濃度を換算した 3 つの濃度間の変動係数は、1.4 ~ 15.4% (標準偏差 0.015 ~ 0.737 $\mu\text{g/L}$) であった。

(製品のデータ : 変動係数 11.8%、標準偏差 0.091 $\mu\text{g/L}$)

プレート間再現性

製品の測定範囲に調製した試験用試料溶液を、同一ロットの 2 プレート (A, B) と、

異なるロット (C) の 1 プレートを同日に測定したプレート間の変動係数は、調製濃度 0.15 $\mu\text{g/L}$ のとき 2.8% (標準偏差 0.006 $\mu\text{g/L}$)、調製濃度 0.5 $\mu\text{g/L}$ のとき 13.0% (標準偏差 0.083 $\mu\text{g/L}$)、調製濃度 1 $\mu\text{g/L}$ のとき 8.4% (標準偏差 0.103 $\mu\text{g/L}$)、調製濃度 5 $\mu\text{g/L}$ のとき 11.9% (標準偏差 0.863 $\mu\text{g/L}$) であった。

(製品のデータ：変動係数 11.7%、標準偏差 0.33 $\mu\text{g/L}$)

交差反応性

交差反応率は、Glyphosine 0.491%、Glufosinate ammonium 0.001% 未満、AMPA 0.013% であった。

(製品のデータ：阻害率 50% B/B0 濃度は、Glyphosine 3000 $\mu\text{g/L}$ 、Glufosinate 70000 $\mu\text{g/L}$ 、AMPA >1000000 $\mu\text{g/L}$)

(2) 実用的な性能

回収特性

河川水に測定範囲の中央付近の (1 $\mu\text{g/L}$) を添加し、さらにフミン酸ナトリウムを添加 (0 および 1 ~ 50mg/L) して測定したところ、換算値は、1.371 $\mu\text{g/L}$ (添加 0)、1.348 $\mu\text{g/L}$ (添加 1mg/L)、1.532 $\mu\text{g/L}$ (添加 5mg/L)、1.572 $\mu\text{g/L}$ (添加 10mg/L)、2.292 $\mu\text{g/L}$ (添加 50mg/L) であり、フミン酸ナトリウムが高濃度になると正の妨害があった。

測定精度等

環境試料として河川水 3 検体を対象とし、ELISA 法と機器分析 (HPLC) により分析を行った。この結果、ELISA 法では 3 検体とも不検出であった。

そこで、環境調査における微量濃度を想定し、河川水に、0.15 $\mu\text{g/L}$ 、0.5 $\mu\text{g/L}$ 、1 $\mu\text{g/L}$ 、5 $\mu\text{g/L}$ 相当のグリホサートを添加して ELISA 法で測定したところ、回収率は順に 161.3%、115.6%、127.3%、122.5% であった。低濃度側が若干高めの傾向があるが、概ね良好な測定結果であり、環境調査にも適用可能であると考えられる。

2 実証対象技術及び実証対象製品の特性と説明

2.1 実証申請者

企 業 名：日本エンバイロケミカルズ株式会社
代 表 者：代表取締役社長 小林 厚夫
担当者所属・氏名：事業開発室 室長 道正 伸
住 所：〒105-0023 東京都港区芝浦一丁目2番1号 シーバンスN館9階
電話番号：03-5444-9891
F A X 番号：03-5444-9860
e-mail アドレス：eco@jechem.co.jp

2.2 実証対象技術の原理

本実証対象製品は、グリホサートに特異的な抗体を応用した、環境中（対象環境媒体：水質、底質、生物）のグリホサート測定 E L I S A キットである。

2.3 実証対象製品のデータ（性能、製品製造者、製品番号等）

実証対象製品のデータは、下表に示すとおりである。

表 2.3 製品データ

項目	内容
製品名	グリホサート ELISA キット
型番	製造元コード：PN500086
販売・製造元	販売：和光純薬工業(株) 輸入：日本エンバイロケミカルズ(株) 製造：Abraxis LLC (米国)
重量 (g)	845g
価格 (円)	要照会
分析対象物質	グリホサート
対象環境媒体	水質・底質・生物 水試料以外は抽出操作が必要
利用用途	環境水のモニタリング
標準試薬・種類	付属 (調製済)
操作環境 (室温)	10 ~ 30
製品保管条件	2 ~ 8
製品保証期間	製造後 12 ヶ月間
同時測定数	43 試料 (n=2 で 1 キット使用時)
測定時間	2 時間 (固相抽出等の前処理時間を除く)

3. 実証試験実施体制

3.1 実証試験申請者

実施責任者：山口県環境生活部 環境生活部長 久保 正人
所属部署：環境生活部環境政策課環境保全室 化学物質対策班
担当者氏名：主幹 嘉村 隆
住所：〒753-8501 山口市滝町 1 番 1 号
電話番号：083-933-3034
F A X 番号：083-933-3049

3.2 実証試験実施者

実施責任者：山口県環境保健研究センター 所長 宮村 恵宣
実証試験担当者氏名：(ELISA 法)生物学部 専門研究員 吹屋 貞子
(機器分析法)水質部 主任 田中 克正
専門研究員 下濃 義弘
連絡窓口：企画情報室 室長 古谷 長藏
住所：〒753-0871 山口市朝田 5 3 5
電話番号：083-924-3670
F A X 番号：083-924-3673
e-mail アドレス：furutani.chozo@pref.yamaguchi.lg.jp

3.3 実証試験実施場所

(1) E L I S A 法

山口県環境保健研究センター 葵庁舎

(2) 機器分析法

山口県環境保健研究センター 大歳庁舎

3.4 実証試験実施期間

平成 17 年 10 月 25 日～平成 18 年 2 月 3 日

4. 試験方法

4.1 共通して行う試験操作

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。

(1) 製品の操作

製品の操作にあたっては、製品の取扱説明書を遵守するとともに、「品質管理マニュアル ELISA 法（グリホサート）」の試験操作手順に従って行った。

(2) 検量線作成用標準溶液

キットに付属する標準物質の希釈濃度系列（以下、指定濃度系列：調製済）を使用した。

(3) 吸光度の測定

吸光度は、マイクロプレートリーダー（バイオ・ラッド社製マイクロプレートリーダーモデル 680XR）で測定した。

(4) 検量線の作成

標準溶液指定濃度系列の吸光度（3重測定の平均値）から、ブランク（検体・抗原酵素複合体の代わりに蒸留水をプレートに加え、同様の操作を行う）を差し引き、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・ラッド社製マイクロプレートマネージャー）

(5) 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（ブランクをさしひいたもの）から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

本製品の測定範囲の試験条件は、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
対象物質	グリホサート
対象製品名	グリホサート ELISA キット
製品番号	ロット番号 5J1741
製造年月日	使用期限：2006年8月
測定範囲（製品仕様）	0.15 ~ 5 µg/L
試験日時	平成 17年 10月 31日 13:30 ~ 16:30
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎
試験時室内温度	19.5 ± 0.5
使用した市販標準品	グリホサート標準品(残留農薬試験用) 試薬会社名：和光純薬工業(株) 製品番号：071-03371 ロット番号：HSP9133
検量線用ソフト名	マイクロプレートマネージャーIII version 1.15
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部 専門研究員 吹屋貞子

試験操作

標準品を用い、蒸留水を希釈液として、試験用試料溶液（0,0.15,0.5,1,5µg/L）を調製した。調製した試験用試料溶液を用いて、各調製濃度につき3重測定を行い、3個の吸光度それぞれから求めた実測濃度より、平均値、標準偏差、変動係数を求めた。

(2)検出下限及び定量下限（検出下限1）

試験条件

本製品の検出下限及び定量下限（検出下限1）の試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.2 検出下限及び定量下限の試験条件（検出下限1）

項目	内容
実証項目	基本的な性能・検出下限及び定量下限
対象物質	グリホサート
対象製品名	グリホサート ELISA キット
製品番号	ロット番号 5J1741
製造年月日	使用期限：2006年8月
測定範囲（製品仕様）	0.15 ~ 5 µg/L
試験日時	平成17年11月2日 13:20 ~ 16:30
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎
試験時室内温度	21.0 ± 0.5
使用した市販標準品	グリホサート標準品(残留農薬試験用) 試薬会社名：和光純薬工業(株) 製品番号：071-03371 ロット番号：HSP9133
検量線用ソフト名	Bio-Rad Microplate Manager III version 1.15
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部 専門研究員 吹屋貞子

試験操作

標準品を用い、蒸留水を希釈液として、試験用試料溶液（0.15 µg/L：測定範囲の下限付近濃度）を調製した。調製した試験用試料溶液を8回測定し、その実測濃度より標準偏差（SD）を求めた。求めたSDから3SD及び10SDをそれぞれ検出下限及び定量下限とした。

(3)検出下限（検出下限2）

試験条件

本製品の検出下限2の試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.3 検出下限の試験条件（検出下限2）

項目	内容
実証項目	基本的な性能・検出下限2
対象物質	グリホサート
対象製品名	グリホサート ELISA キット
製品番号	ロット番号 5J1741
製造年月日	使用期限：2006年8月
測定範囲（製品仕様）	0.15 ~ 5 µg/L
試験日時	平成 17年 10月 31日 13:30 ~ 16:30
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎
試験時室内温度	19.5 ± 0.5
使用した市販標準品等	蒸留水 残留農薬試験用 和光純薬工業（株） 製品番号:040-24081 ロット:KLK9508
検量線用ソフト名	Bio-Rad Microplate Manager III version 1.15
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部 専門研究員 吹屋貞子

試験操作

0濃度（蒸留水）の吸光度を10回測定し、吸光度の標準偏差（SD）を求めた。0濃度の平均吸光度から3SD（吸光度）を差し引いた吸光度での換算濃度を検出下限2とした。

(4) 繰り返し再現性

試験条件

本製品の繰り返し再現性の試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.4 繰り返し再現性の試験条件

項目	内容
実証項目	基本的な性能・繰り返し再現性
対象物質	グリホサート
対象製品名	グリホサート ELISA キット
製品番号	ロット番号 5J1741
製造年月日	使用期限：2006年8月
測定範囲（製品仕様）	0.15 ~ 5 µg/L
試験日時	平成 17 年 11 月 8 日 9:00 ~ 12:00
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎
試験時室内温度	18.0 ± 0.5
使用した市販標準品	グリホサート標準品(残留農薬試験用) 試薬会社名：和光純薬工業(株) 製品番号：071-03371 ロット番号：HSP9133
検量線用ソフト名	Bio-Rad Microplate Manager III version 1.15
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部 専門研究員 吹屋貞子

試験操作

標準品を用い、蒸留水を希釈液として、試験用試料溶液(1µg/L：測定範囲の中央付近)を調製した。調製した試験用試料溶液を8回測定(3重測定)し、その実測濃度より、平均値、標準偏差、変動係数を求め、繰り返し再現性について検討した。

(5)日間再現性

試験条件

本製品の日間再現性の試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.5 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
対象物質	グリホサート
対象製品名	グリホサート ELISA キット
製品番号	ロット番号 5J1741
製造年月日	使用期限：2006年8月
測定範囲（製品仕様）	0.15 ~ 5 µg/L
試験日時	1日目 平成17年10月31日 13:30~16:30 2日目 平成17年11月1日 14:30~17:30 3日目 平成17年11月2日 13:20~16:30
試験場所	山口県環境保健研究センター 薬庁舎
試験時室内温度	1日目 19.5 ± 0.5 2日目 20.0 ± 0.5 3日目 21.0 ± 0.5
使用した市販標準品	グリホサート標準品(残留農薬試験用) 試薬会社名：和光純薬工業(株) 製品番号：071-03371 ロット番号：HSP9133
検量線用ソフト名	Bio-Rad Microplate Manager III version 1.15
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部 専門研究員 吹屋貞子

試験操作

同一測定者が1週間の異なる3日間において、同一ロットの異なるプレートを用いて、「(1)測定範囲」と同じ測定操作を行った。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、3日間の比較から日間再現性について検討した。

(6)期間再現性

試験条件

本製品の期間再現性の試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.6 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
対象物質	グリホサート
対象製品名	グリホサート ELISA キット
製品番号	ロット番号： 5J1741
製造年月日	使用期限： 2006 年 8 月
測定範囲（製品仕様）	0.15 ~ 5 µg/L
試験日時	1 回目 平成 17 年 10 月 31 日 13:30 ~ 16:30 2 回目 平成 17 年 12 月 2 日 9:50 ~ 12:20
試験場所	山口県環境保健研究センター 薬庁舎
試験時室内温度	1 回目 19.5 ± 0.5 2 回目 17.5 ± 1.0
使用した市販標準品	グリホサート標準品(残留農薬試験用) 試薬会社名：和光純薬工業(株) 製品番号：071-03371 ロット番号：HSP9133
検量線用ソフト名	Bio-Rad Microplate Manager III version 1.15
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部 専門研究員 吹屋貞子

試験操作

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

(7)プレート間再現性

試験条件

本製品のプレート間再現性の試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.7 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
対象物質	グリホサート
対象製品名	グリホサート ELISA キット
製品番号	ロット番号 AおよびB : 5J1741, C : 5G1675
製造年月日	使用期限 : 2006年8月
測定範囲(製品仕様)	0.15 ~ 5 µg/L
試験日時	A 平成17年11月8日 9:00~12:00 B 12:30~15:20 C 15:20~18:10
試験場所	山口県環境保健研究センター 薬庁舎
試験時室内温度	A 18.0 ± 0.5 B 19.0 ± 0.5 C 19.0 ± 0.5
使用した市販標準品	グリホサート標準品(残留農薬試験用) 試薬会社名 : 和光純薬工業(株) 製品番号 : 071-03371 ロット番号 : HSP9133
検量線用ソフト名	Bio-Rad Microplate Manager III version 1.15
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部 専門研究員 吹屋貞子

試験操作

同一ロット2プレート及び異なるロット1プレートの3プレートを用いて、同日に「(1)測定範囲」と同じ測定操作を行った。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、同一ロット及び異なるロットの比較からプレート間再現性について検討した。

(8)交差反応性

試験条件

本製品の交差反応性の試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.2.8 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
対象物質	グリホサート
対象製品名	グリホサート ELISA キット
製品番号	ロット番号 5J1741
製造年月日	使用期限：2006年8月
測定範囲（製品仕様）	0.15 ~ 5 µg/L
試験日時	平成17年11月21日 11:30 ~ 14:50
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎
試験時室内温度	19.0 ± 0.5
使用した市販標準品等	グリホサート標準品(残留農薬試験用) 試薬会社名：和光純薬工業(株) 製品番号：071-03371 ロット番号：HSP9133 Glyphosine 試薬会社名：Chem Service Inc. 製品番号：PS2164 ロット番号：352-19B Glufosinate ammonium 試薬会社名：Dr.Ehrenstorfer GmbH 製品番号：CA14030000 ロット番号：31219 AMPA 試薬会社名：東京化成工業(株) 製品番号：A1072 ロット番号：FHL01
検量線用ソフト名	Bio-Rad Microplate Manager III version 1.15
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部 専門研究員 吹屋貞子

試験操作

グリホサート及び類似物質（Glyphosine、Glufosinate ammonium、AMPA）について調製した試料溶液で吸光度曲線（3重測定）を描き、それぞれの50%発色阻害濃度を求めた。

（グリホサートの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した。実用的な濃度で50%発色阻害が得られなかった場合は、より低い発色阻害率の濃度で交差率を求めた。

4.3 実用的な性能

(1)回収特性

試験条件

本製品の回収特性の試験条件は、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
対象物質	グリホサート
対象製品名	グリホサート ELISA キット
製品番号	ロット番号 5J1741
製造年月日	使用期限：2006年8月
測定範囲（製品仕様）	0.15 ~ 5 µg/L
試験日時	平成 17 年 12 月 2 日 14:50 ~ 17:30
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎
試験時室内温度	19.0
使用した市販標準品	グリホサート標準品(残留農薬試験用) 試薬会社名：和光純薬工業(株) 製品番号：071-03371 ロット番号：HSP9133
検量線用ソフト名	Bio-Rad Microplate Manager III version 1.15
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部 専門研究員 吹屋貞子

表 4.3.2 使用した河川水

試料番号	地点名	採水日	採水量	備考
2	一の坂川	平成 17 年 11 月 28 日	4L×3本	pH 8.0 COD 1.7mg/L

試験操作

GF/C を用いて河川水をろ過したろ液を原水とし、それに測定範囲の中央付近となるようにグリホサートを添加(1µg/L)するとともに、環境試料を想定した妨害物質としてフミン酸ナトリウムを添加(0, 1, 5, 10, 50 mg/L)して、試験用試料溶液を調製した。

なお、フミン酸ナトリウムは、含量 50~60%の表示であったことから、平均含量 55%として試料の調製を行った。

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

(2)測定精度等

(2)-1 実試料分析

試験条件

本製品の測定精度等の試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.3.3 測定精度の試験条件

項目	内容
実証項目	実用的な性能・測定精度・実試料分析
対象物質	グリホサート
対象製品名	グリホサート ELISA キット
製品番号	ロット番号 5J1741
製造年月日	使用期限：2006年8月
測定範囲（製品仕様）	0.15 ~ 5 µg/L
試験日時	平成 17 年 11 月 30 日 10:10 ~ 12:50
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎 山口県環境保健研究センター 大歳庁舎
試験時室内温度	18.0 ± 0.5
使用した市販標準品	グリホサート標準品(残留農薬試験用) 試薬会社名：和光純薬工業(株) 製品番号：071-03371 ロット番号：HSP9133
検量線用ソフト名	Bio-Rad Microplate Manager III version 1.15
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部 専門研究員 吹屋貞子 山口県環境保健研究センター水質部 主任 田中克正 山口県環境保健研究センター水質部 専門研究員 下濃義弘

表4.3.4 使用した環境試料

試料番号	地点名	採水日	採水量	備考
1	九田川	平成 17 年 11 月 28 日	4L × 3 本	pH 8.8, COD 3.6mg/L
2	一の坂川	平成 17 年 11 月 28 日	4L × 3 本	pH 8.0, COD 1.7mg/L
3	前田川	平成 17 年 11 月 28 日	4L × 3 本	pH 7.0, COD 2.0mg/L

河川水は、GF/C を用いてろ過したものを試料として使用した。

試験操作

ELISA 法は試料そのままを測定対象とし、機器分析は試料 50ml 分取し、蛍光誘導体化後、HPLC・蛍光検出器（励起波長 270nm、測定波長 315nm）により測定を行った。

なお、HPLC 条件は、カラム Shimpack CLC-NH₂(M) (150mmL. × 4.6mm)、溶離液 0.1mKH₂PO₄:CH₃CN(7:3)、流速 1.0ml/min、カラム温度 40 °C、試料注入量 20 µl とした。

(2)-2 実試料添加試験

試験条件

本製品の測定精度等の試験条件は、下表に示すとおりである。

表 4.3.5 測定精度の試験条件

項目	内容
実証項目	実用的な性能・測定精度・実試料添加試験
対象物質	グリホサート
対象製品名	グリホサート ELISA キット
製品番号	ロット番号 5J1741
製造年月日	使用期限：2006年8月
測定範囲（製品仕様）	0.15 ~ 5 µg/L
試験日時	平成 18 年 2 月 3 日 13:40 ~ 16:20
試験場所	山口県環境保健研究センター 葵庁舎 山口県環境保健研究センター 大歳庁舎
試験時室内温度	19.5 ± 0.5
使用した市販標準品	グリホサート標準品(残留農薬試験用) 試薬会社名：和光純薬工業(株) 製品番号：071-03371 ロット番号：HSP9133
検量線用ソフト名	Bio-Rad Microplate Manager III version 1.15
試験機関・担当者	山口県環境保健研究センター生物学部 専門研究員 吹屋貞子 山口県環境保健研究センター水質部 主任 田中克正 山口県環境保健研究センター水質部 専門研究員 下濃義弘

表4.3.6 使用した環境試料

試料番号	地点名	採水日	採水量	備考
4	二ツ堂川	平成 18 年 1 月 10 日	4L×4本	pH 6.5, COD 0.5mg/L

試験操作

環境調査において当 ELISA キットが適用できるかどうか確認するため、標準品の添加実験を行った。グリホサートの添加濃度は、0、0.15、0.5、1、1.5 µg/L とし、ELISA 法で3重測定した。(グリホサートの水道水の水質管理目標値は 2mg/L であり、当キットの感度は十分であるが、環境水レベルでの適用性を確認するため、このような濃度レベルとした。)

なお、使用した河川水は、事前に ELISA 法でグリホサートが検出されないことを確認したものであり、懸濁物の影響を避けるため、採取日当日にグラスファイバーフィルター(GFC：孔径 1.2 µm)を用いてろ過したものを冷暗所保存し使用した。

5. 試験結果

5.1 基本的な性能

(1) 測定範囲

この試験における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.1 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液					
		STD0	STD1	STD2	STD3	STD4	
所定濃度	μg/L	0	0.15	0.5	1	5	
実測回数	回	3					
ELISA 実測 (吸光度*)	1	-	1.458	1.195	0.951	0.739	0.256
	2	-	1.483	1.278	1.025	0.713	0.224
	3	-	1.537	1.329	1.005	0.722	0.242

* : ブランクの吸光度を差し引いたもの

採用した回帰式 (Y : 吸光度 X : 濃度(μg/L))

$$Y = (-0.043 - 1.490) / (1 + (X / 1.035)^{-0.945}) + 1.490 \quad R^2 = 0.999$$

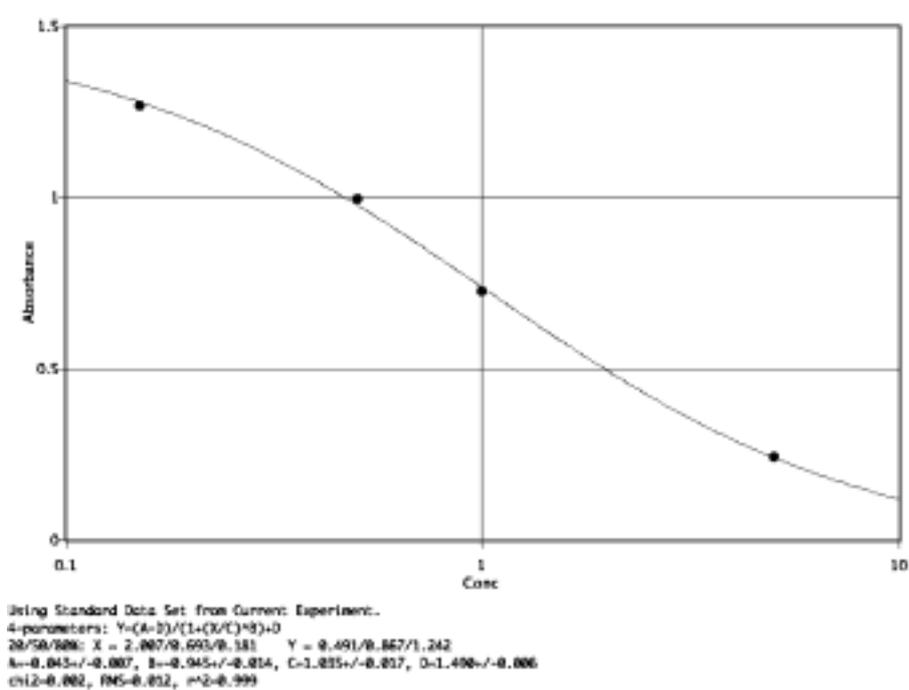


図 5.1.1 検量線

この試験における測定データは、以下に示すとおりである。

表 5.1.2 試料溶液の測定データ (測定範囲)

項目	単位	試験用試料溶液						
		溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4	溶液 S5		
調製濃度	μg/L	0	0.15	0.5	1	5		
実測回数	回	3						
ELISA 実測	吸光度	1	-	1.465	1.195	0.882	0.571	0.186
		2	-	1.492	1.257	0.893	0.606	0.191
		3	-	1.485	1.234	0.941	0.668	0.189
		平均	-	1.481	1.229	0.905	0.615	0.189
	換算値	μg/L	0.005	0.194	0.620	1.399	6.424	
標準偏差	μg/L	-	0.030	0.056	0.191	0.087		
変動係数	%	-	15.4	9.0	13.5	1.4		
相対値**	%	-	129.3	124.0	139.9	128.5		

* ブランクの吸光度を差し引いたもの ** 調製濃度を 100%としたときの各実測濃度の割合 (%)

調製濃度 0.15 ~ 5 μg/L での変動係数は 1.4 ~ 15.4 %、相対値は 124.0 ~ 139.9 % であった。