

表 5.1.10.1 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	STD1	STD2	STD3	STD4	
所定濃度	μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	2.031	1.529	1.165	0.683	0.258
	2	-	2.024	1.534	1.183	0.694	0.268
	3	-	2.027	1.536	1.183	0.690	0.264

表 5.1.11.1 採用した回帰式係数[Y = B + (A B)/(1 + (C * X^N))の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	2.03	-0.0689	3.25	1.26	*

* ソフトウェアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.1.4.1 検量線

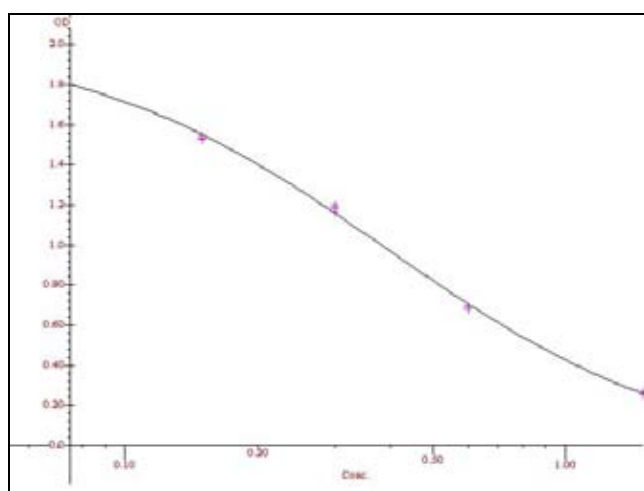


表 5.1.10.2 検量線用標準溶液の測定データ

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	STD1	STD2	STD3	STD4	
所定濃度	μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.933	1.371	1.053	0.573	0.200
	2	-	1.963	1.407	1.102	0.567	0.216
	3	-	2.012	1.460	1.129	0.623	0.233

表 5.1.11.2 採用した回帰式係数[Y = B + (A B)/(1 + (C * X^N))の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	1.97	-0.103	3.45	1.22	*

* ソフトウェアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.1.4.2 検量線

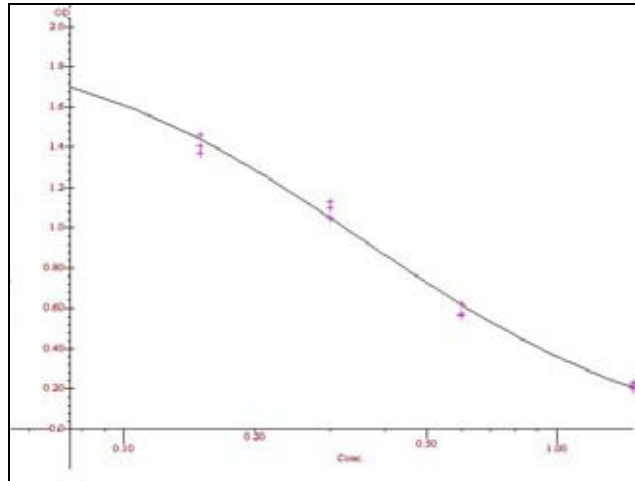


表 5.1.10.3 検量線用標準溶液の測定データ

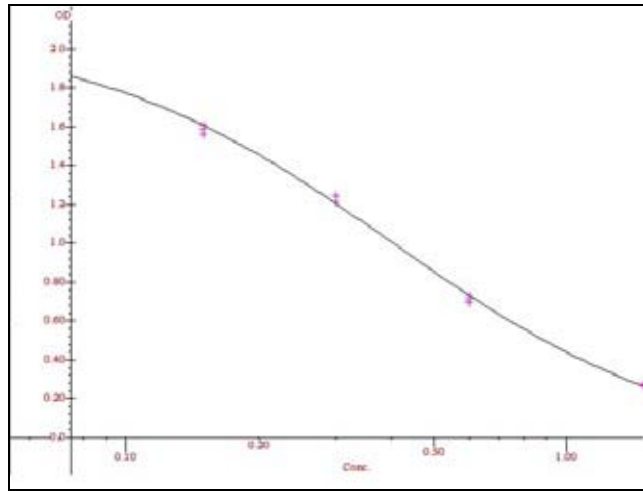
項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	STD1	STD2	STD3	STD4	
所定濃度	μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	2.062	1.566	1.249	0.732	0.277
	2	-	2.103	1.590	1.246	0.712	0.266
	3	-	2.116	1.610	1.217	0.696	0.269

表 5.1.11.3 採用した回帰式係数[Y = B + (A B)/(1 + (C * X^N))の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	2.09	-0.0776	3.19	1.27	*

* ソフトウェアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.1.4.3 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 対象物質試料溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液																
		溶液 S1			溶液 S2			溶液 S3			溶液 S4			溶液 S5				
		1 日	2 日	3 日	1 日	2 日	3 日	1 日	2 日	3 日	1 日	2 日	3 日	1 日	2 日	3 日		
調製濃度	μg/L	0	0	0	0.15	0.15	0.15	0.30	0.30	0.30	0.60	0.60	0.60	1.5	1.5	1.5		
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
ELISA 実測	吸光度	1	-	1.985	2.007	2.097	1.561	1.443	1.568	1.200	1.038	1.111	0.669	0.572	0.588	0.273	0.232	0.239
		2	-	2.069	2.032	2.064	1.578	1.454	1.582	1.178	1.048	1.104	0.660	0.575	0.589	0.269	0.226	0.237
		3	-	2.089	2.067	2.123	1.595	1.471	1.579	1.210	1.042	1.099	0.677	0.571	0.590	0.270	0.238	0.236
	平均	-	2.048	2.035	2.098	1.578	1.456	1.576	1.196	1.043	1.105	0.669	0.573	0.589	0.271	0.232	0.237	
換算値	μg/L			-	0.14	0.15	0.16	0.28	0.30	0.35	0.64	0.65	0.76	1.5	1.4	1.6		
標準偏差	μg/L		-		0.010			0.033			0.066			0.12				
変動係数	%		-		6.7			11			9.7			8.0				

(5) 期間再現性

検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.13.1 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	STD1	STD2	STD3	STD4	
所定濃度	μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	2.062	1.566	1.249	0.732	0.277
	2	-	2.103	1.590	1.246	0.712	0.266
	3	-	2.116	1.610	1.217	0.696	0.269

表 5.1.14.1 採用した回帰式係数[Y = B + (A B)/(1 + (C * X^N))の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	2.09	-0.0776	3.19	1.27	*

* ソフトウェアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.1.5.1 検量線

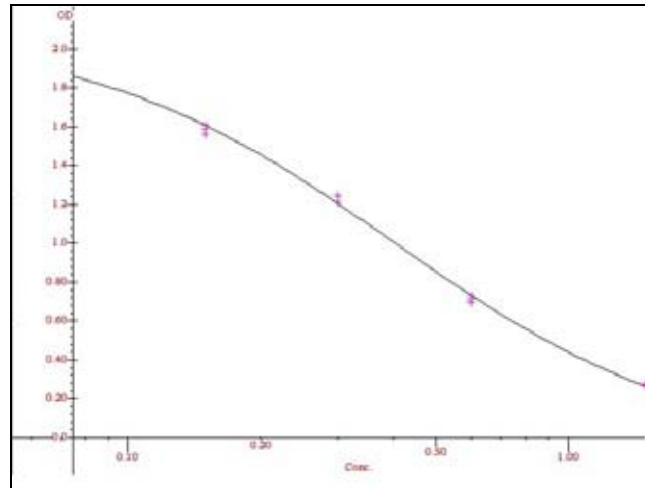


表 5.1.13.2 検量線用標準溶液の測定データ

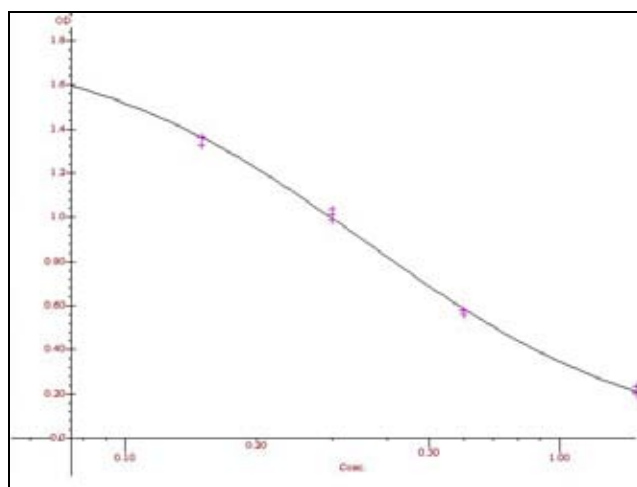
項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	STD1	STD2	STD3	STD4	
所定濃度	μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.774	1.327	0.988	0.578	0.203
	2	-	1.839	1.361	1.015	0.559	0.236
	3	-	1.802	1.368	1.039	0.584	0.210

表 5.1.14.2 採用した回帰式係数[Y = B + (A B)/(1 + (C * X^N))の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	1.80	-0.028	3.88	1.32	*

* ソフトウェアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.1.5.2 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 5.1.15 対象物質試料溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液											
		溶液 S1		溶液 S2		溶液 S3		溶液 S4		溶液 S5			
		0	1ヶ月	0	1ヶ月	0	1ヶ月	0	1ヶ月	0	1ヶ月		
調製濃度	μg/L	0	0	0.15	0.15	0.30	0.30	0.60	0.60	1.5	1.5		
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
ELISA 実測	吸光度	1	-	2.097	1.756	1.568	1.299	1.111	0.955	0.588	0.469	0.239	0.213
		2	-	2.014	1.743	1.582	1.276	1.104	0.978	0.589	0.487	0.236	0.223
		3	-	2.123	1.866	1.579	1.276	1.099	0.969	0.590	0.492	0.237	0.210
		平均	-	2.095	1.788	1.576	1.284	1.105	0.967	0.589	0.483	0.237	0.215
換算値	μg/L	-	-	0.16	0.17	0.35	0.31	0.76	0.74	1.6	1.5		
標準偏差	μg/L	-	-	0.0022	0.013	0.0024	0.0050	0.00082	0.015	0.0059	0.029		
変動係数	%	-	-	1.4	7.8	0.70	1.6	0.11	2.0	0.36	2.0		

(6) プレート間再現性

検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.1.16.1 検量線用標準溶液の測定データ(プレート A)

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	STD1	STD2	STD3	STD4	
所定濃度	μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	2.062	1.566	1.249	0.732	0.277
	2	-	2.103	1.590	1.246	0.712	0.266
	3	-	2.116	1.610	1.217	0.696	0.269

表 5.1.17.1 採用した回帰式係数[Y = B + (A B)/(1 + (C * X^N))の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	2.09	-0.0776	3.19	1.27	*

* ソフトウェアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.1.6.1 検量線

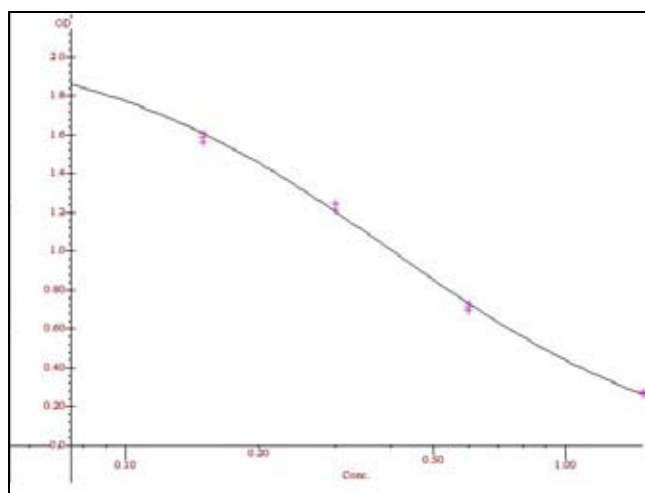


表 5.1.16.2 検量線用標準溶液の測定データ(プレート B)

項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	STD1	STD2	STD3	STD4	
所定濃度	μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.925	1.591	1.290	0.702	0.258
	2	-	2.017	1.651	1.243	0.702	0.250
	3	-	2.427	1.658	1.272	0.696	0.256

表 5.1.17.2 採用した回帰式係数[Y = B + (A B)/(1 + (C * X^N))の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	2.12	-0.0537	3.58	1.36	*

* ソフトウェアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.1.6.2 検量線

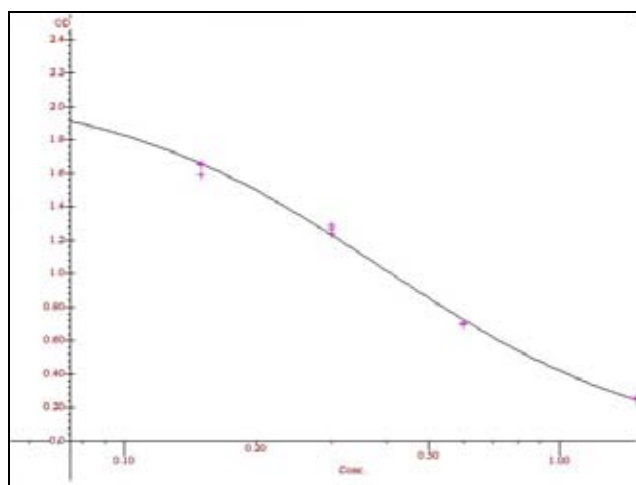


表 5.1.16.3 検量線用標準溶液の測定データ(プレート C)

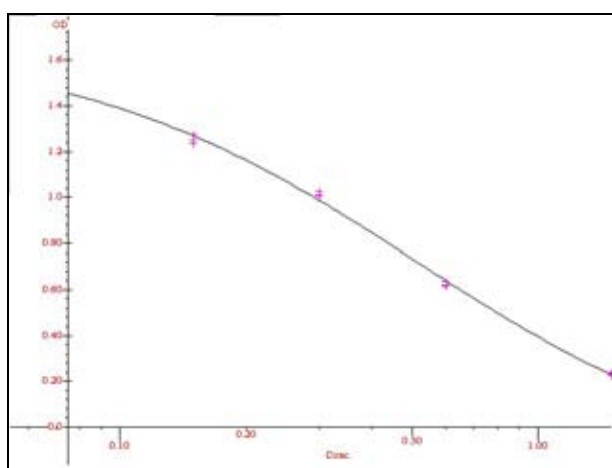
項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	STD1	STD2	STD3	STD4	
所定濃度	μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.659	1.274	1.004	0.636	0.227
	2	-	1.707	1.249	1.028	0.618	0.238
	3	-	1.650	1.237	1.009	0.620	0.233

表 5.1.17.3 採用した回帰式係数[Y = B + (A B)/(1 + (C * X^N))の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	1.67	-0.231	2.04	1.07	*

* ソフトウェアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.1.6.3 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。

(A,B:同一ロット、C:異なるロット)

表 5.1.18 対象物質試料溶液の測定データ

項目	単位	試験用試料溶液																
		溶液 S1			溶液 S2			溶液 S3			溶液 S4			溶液 S5				
		プレート A	プレート B	プレート C	プレート A	プレート B	プレート C	プレート A	プレート B	プレート C	プレート A	プレート B	プレート C	プレート A	プレート B	プレート C		
調製濃度	μg/L	0	0	0	0.15	0.15	0.15	0.30	0.30	0.30	0.60	0.60	0.60	1.5	1.5	1.5		
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
ELISA 実測	吸光度	1	-	2.097	2.204	1.682	1.568	1.652	1.259	1.111	1.199	0.951	0.588	0.636	0.548	0.239	0.235	0.219
		2	-	2.064	2.222	1.733	1.582	1.641	1.274	1.104	1.217	0.949	0.589	0.618	0.287	0.237	0.233	0.218
		3	-	2.123	2.293	1.755	1.579	1.645	1.316	1.099	1.219	0.992	0.590	0.618	0.559	0.236	0.235	0.223
	平均	-	2.095	2.240	1.723	1.576	1.646	1.283	1.105	1.212	0.964	0.589	0.624	0.553	0.237	0.234	0.220	
換算値	μg/L	-	-	-	0.160	0.154	0.133	0.348	0.307	0.315	0.761	0.701	0.716	1.62	1.56	1.53		
標準偏差	μg/L	-			0.014			0.022			0.031			0.044				
変動係数	%	-			9.4			6.7			4.3			2.8				

(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 5.1.19 検量線用標準溶液の測定データ

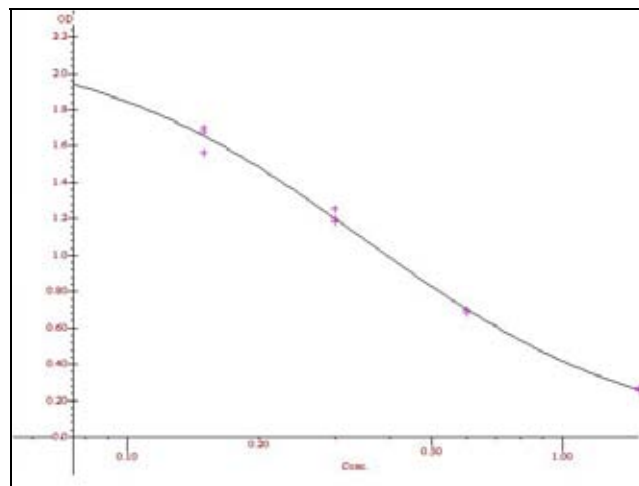
項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	STD1	STD2	STD3	STD4	
所定濃度	μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	2.121	1.562	1.183	0.701	0.267
	2	-	2.197	1.702	1.203	0.702	0.258
	3	-	2.234	1.677	1.259	0.684	0.262

表 5.1.20 採用した回帰式係数[Y = B + (A B) / (1 + (C * X^N)) の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	2.08	0.0195	1.16	1.13	*

* ソフトウェアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.1.7.1 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 5.1.21 交差率

	クロロタロニル	フサライド	PCP
50%阻害濃度 (µg/L)	0.27	087	228
交差率(%)	100	31	0.12

表 5.1.22.1 対象物質試料溶液の測定データ

クロロタロニル	単位	試験用試料溶液					
		溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4	溶液 S5	
所定濃度	µg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	2.135	1.563	1.130	0.627	0.252
	2	-	2.098	1.558	1.204	0.632	0.287
	3	-	2.204	1.603	1.189	0.654	0.280

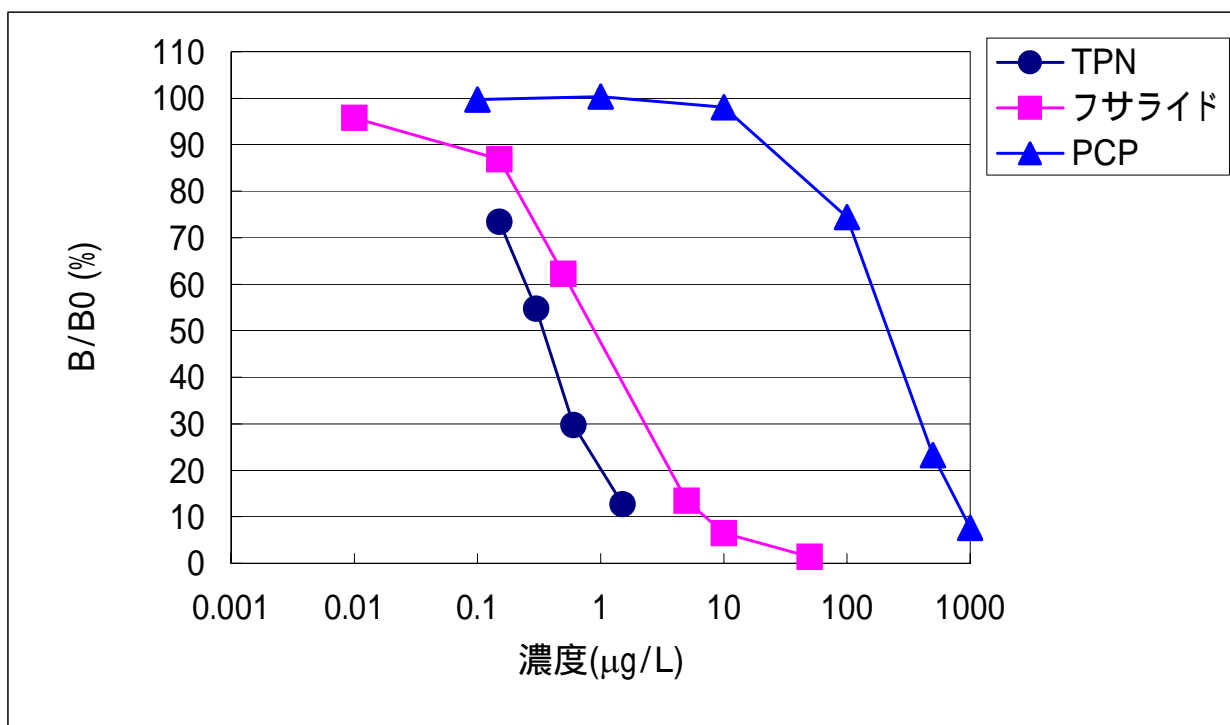
表 5.1.22.2 交差反応性物質試料溶液の測定データ

フサライド	単位	試験用試料溶液						
		溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4	溶液 S5	溶液 S6	
所定濃度	µg/L	0.01	0.15	0.5	5	10	50	
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	2.069	1.878	1.351	0.285	0.137	0.030
	2	-	2.058	1.853	1.334	0.287	0.140	0.029
	3	-	2.036	1.858	1.336	0.291	0.141	0.029

表 5.1.22.3 交差反応性物質試料溶液の測定データ

PCP	単位	試験用試料溶液						
		溶液 S1	溶液 S2	溶液 S3	溶液 S4	溶液 S5	溶液 S6	
所定濃度	µg/L	0.1	1	10	100	500	1000	
実測回数	回	3	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	2.141	2.154	2.068	1.581	0.501	0.153
	2	-	2.175	2.186	2.081	1.620	0.509	0.166
	3	-	2.104	2.286	2.166	1.592	0.490	0.169

図 5.1.7.2 交差反応性



5.2 実用的な性能

(1) 回収特性

検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.2.1 検量線用標準溶液の測定データ

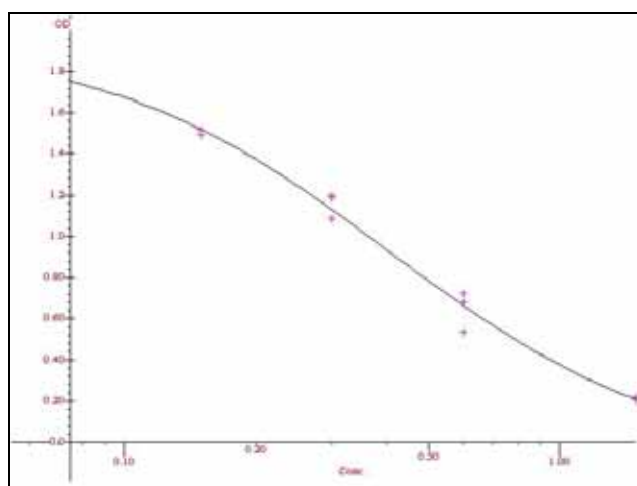
項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	STD1	STD2	STD3	STD4	
所定濃度	μg/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.978	1.492	1.191	0.723	0.216
	2	-	1.951	1.521	1.200	0.681	0.218
	3	-	1.937	1.492	1.085	0.532	0.202

表 5.2.2 採用した回帰式係数[Y = B + (A B) / (1 + (C * X^N)) の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	1.95	-0.102	3.30	1.33	*

* ソフトウェアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.2.1 検量線



試験結果

河川水に測定範囲の中央付近（終濃度：0.5 μ g/L）のクロロタロニルを添加し、さらにフミン酸ナトリウムを添加（終濃度：0,1,5,10,50mg/L）した試験用試料溶液の測定結果は、以下のとおりであった。

表 5.2.3 回収特性の測定データ

項目		単位	試験用試料溶液(クロロタロニル 0.5 μ g/L 添加)					
フミン酸 Na 添加量		mg/L	0	1	5	10	50	
実測回数		回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測	吸光度	1	-	0.702	0.705	0.607	0.674	0.363
		2	-	0.698	0.700	0.610	0.636	0.358
		3	-	0.696	0.678	0.632	0.636	0.369
		平均	-	0.699	0.694	0.616	0.649	0.363
換算値		μ g/L	0.570	0.574	0.649	0.618	1.025	
標準偏差		μ g/L	0.0028	0.014	0.015	0.026	0.013	
変動係数		%	0.44	2.2	2.1	3.7	1.2	
回収率		%	114	115	130	124	205	

(2) 測定精度等

検量線作成記録

本製品における検量線の作成記録は、以下に示すとおりである。

表 5.2.4 検量線用標準溶液の測定データ

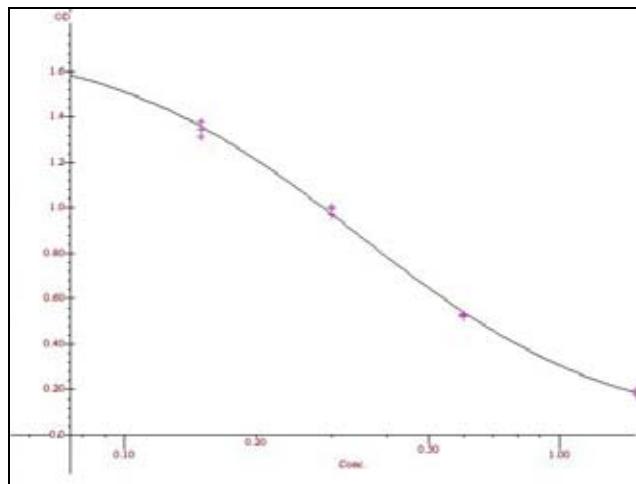
項目	単位	検量線用標準溶液					
		ブランク	溶液 STD1	溶液 STD2	溶液 STD3	溶液 STD4	
所定濃度	μ g/L	0	0.15	0.30	0.60	1.5	
実測回数	回	3	3	3	3	3	
ELISA 実測 (吸光度)	1	-	1.791	1.380	1.005	0.525	0.197
	2	-	1.744	1.343	0.999	0.532	0.200
	3	-	1.726	1.316	0.971	0.527	0.174

表 5.2.5 採用した回帰式係数[Y = B + (A B)/(1 + (C * X^N))の場合)

回帰式の係数	A	B	C	N	R^2
値	1.75	0.00540	4.78	1.48	*

* ソフトウェアの仕様のため R^2 は計算されない

図 5.2.2 検量線



試験結果記録

名古屋市内 3 地点における河川水中に含まれるクロロタロニル濃度は以下のとおりであった。

表 5.2.6 実試料での測定結果

項目	単位	試験用試料溶液			
		大森橋	明德橋	日の出橋	
実測回数	回	3	3	3	
ELISA 吸光度	1	-	1.882	1.952	2.026
	2	-	1.906	1.915	2.004
	3	-	1.872	2.051	1.982
	平均	-	1.887	1.973	1.987
換算値	μg/L	-	-	-	
標準偏差	μg/L	-	-	-	
変動係数	%	-	-	-	
GC/MS 測定値	1	μg/L	ND	ND	ND
	2	μg/L	ND	ND	ND
	3	μg/L	ND	ND	ND
	平均	μg/L	-	-	-
	標準偏差	μg/L	-	-	-
	変動係数	%	-	-	-

濃度の単位はμg/L。ELISA の検出下限 1 は 0.016μg/L、検出下限 2 は 0.011μg/L。

GC/MS の検出下限(MDL)は 0.0069 μg/L。

表 5.2.7 添加回収試験結果 (クロロタロニル 0.17 $\mu\text{g/L}$ 添加)

項目	単位	試験用試料溶液				
		大森橋	明德橋	日の出橋		
実測回数	回	3	3	3		
E L I S A	吸 光 度	1	-	1.248	1.198	1.208
		2	-	1.292	1.192	1.195
		3	-	1.285	1.204	1.253
		平均	-	1.275	1.198	1.219
	換算値	$\mu\text{g/L}$	0.18	0.21	0.20	
	標準偏差	$\mu\text{g/L}$	0.0081	0.0020	0.0112	
	変動係数	%	4.6	1.0	5.6	
	回収率	%	107	123	118	
G C / M S	測 定 値	1	$\mu\text{g/L}$	0.19	0.21	0.18
		2	$\mu\text{g/L}$	0.21	0.20	0.19
		3	$\mu\text{g/L}$	0.18	0.18	0.19
		平均	$\mu\text{g/L}$	0.19	0.20	0.19
	標準偏差	$\mu\text{g/L}$	0.015	0.015	0.0058	
	変動係数	%	7.1	7.8	3.0	
	回収率	%	114	115	111	

濃度の単位は $\mu\text{g/L}$ 。ELISA の検出下限 1 は 0.016 $\mu\text{g/L}$ 、検出下限 2 は 0.011 $\mu\text{g/L}$ 。

GC/MS の検出下限(MDL)は 0.0069 $\mu\text{g/L}$ 。

6. 実証試験結果の検討と考察

(1) 製品性能の信頼性

実証試験で実施した基本性能7項目の全てについて、申請データ(0.15～1.5 µg/L)の濃度範囲において十分な信頼性が確認された。

(2) 一般環境モニタリングでの実用性

河川水試料ろ過水を用いた添加回収試験の結果から、妨害物質(フミン酸ナトリウム)による正の妨害は認められたものの、検出感度及び測定精度とも実用に耐えうると考えられた。今後、マトリックスの異なる環境試料に対するデータを蓄積することにより、環境モニタリングへの実用化が可能と考えられた。

(3) 製品操作等の簡便性

一般環境モニタリングでの使用を想定した場合、測定結果が得られるまで約2～3時間で、同時に最大26試料(3重測定)の測定が可能となる。なお、本試験でのGC/MS-SIM法では、3試料(3重測定)の測定に約3日が必要であった。

取扱説明書については、わかりやすく説明しており、特に問題はないと考えられる。

(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	《技術名》ELISA法（酵素免疫測定法） 《製品名》クロロタロニル測定キットE

平成17年10月

名古屋市

はじめに

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

(実証機関)

名古屋市環境科学研究所

所 長 柴田 伸幸

(環境技術開発者)

株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー

代表取締役社長 河野 猛

目 次

1 . 実証試験の概要と目的	1
1.1 実証試験の概要と目的	1
1.2 実証試験の視点	1
2 . 実証試験の参加組織と実証試験参加者の責任分掌	2
2.1 実証試験の参加組織	2
2.2 実施体制	2
2.3 実証試験参加者の責任分掌	3
3 . 実証試験の対象とする化学物質簡易モニタリング技術の概要	4
3.1 実証対象技術の原理	4
3.2 実証対象製品のデータ	4
4 . 実証試験のデザイン	6
4.1 実証試験の期間	6
4.2 実証試験の内容	7
4.3 実証対象製品の受け入れと管理	8
4.4 実証試験の方法	10
(1) 基本的な性能試験	11
測定範囲試験	11
検出下限及び定量下限試験	11
繰返し再現性試験	11
日間再現性試験	12
期間再現性試験	12
プレート間再現性試験	12
交差反応性試験	12
(2) 実用的な性能試験	13
回収特性試験	13
測定精度試験	13
5 . データの品質管理	14
6 . データの管理、分析、表示	14
7 . 監査	14
8 . 評価	14

付録 1 : 技術の先進性、その他	1 5
付録 2 : 環境技術開発者による性能試験結果 (資料 1 ~ 資料 5)	1 6
付録 3 : 取扱説明書	2 6
付録 4 : 品質管理マニュアル ELISA 法	
付録 5 : 品質管理マニュアル 機器分析	

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、抗原抗体反応を応用した酵素標識免疫測定法（ELISA法）による簡易分析技術とする。

1.2 実証試験の視点

本実証試験では、以下の視点から実証を行うものとする。

製品性能の信頼性

一般環境モニタリングでの実用性

製品操作等の簡便性

2. 実証試験参加組織と実証試験参加者の責任分掌

2.1 実証試験参加組織

実証試験に参加する組織は、下表に示すとおりである。

表 2.1 実証試験参加組織

実証機関	団体名	名古屋市環境科学研究所
	住所	〒457-0841 名古屋市南区豊田 5-16-8
	担当者所属・氏名	水質部 小島節子
	電話番号	052-692-8481
	FAX 番号	052-692-8483
	E-mail アドレス	kojima@nagoyakankaken.office.to
環境技術開発者	企業名	株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー
	住所	〒601-8315 京都市南区吉祥院車道町 48 番地
	担当者所属・氏名	試薬事業部 開発・製造部 伊東 茂壽
	電話番号	075-692-1786
	FAX 番号	075-692-1790
	E-mail アドレス	Shigekazu.ito@horiba.com

2.2 実施体制

実証試験の実施体制は、下図に示すとおりである。

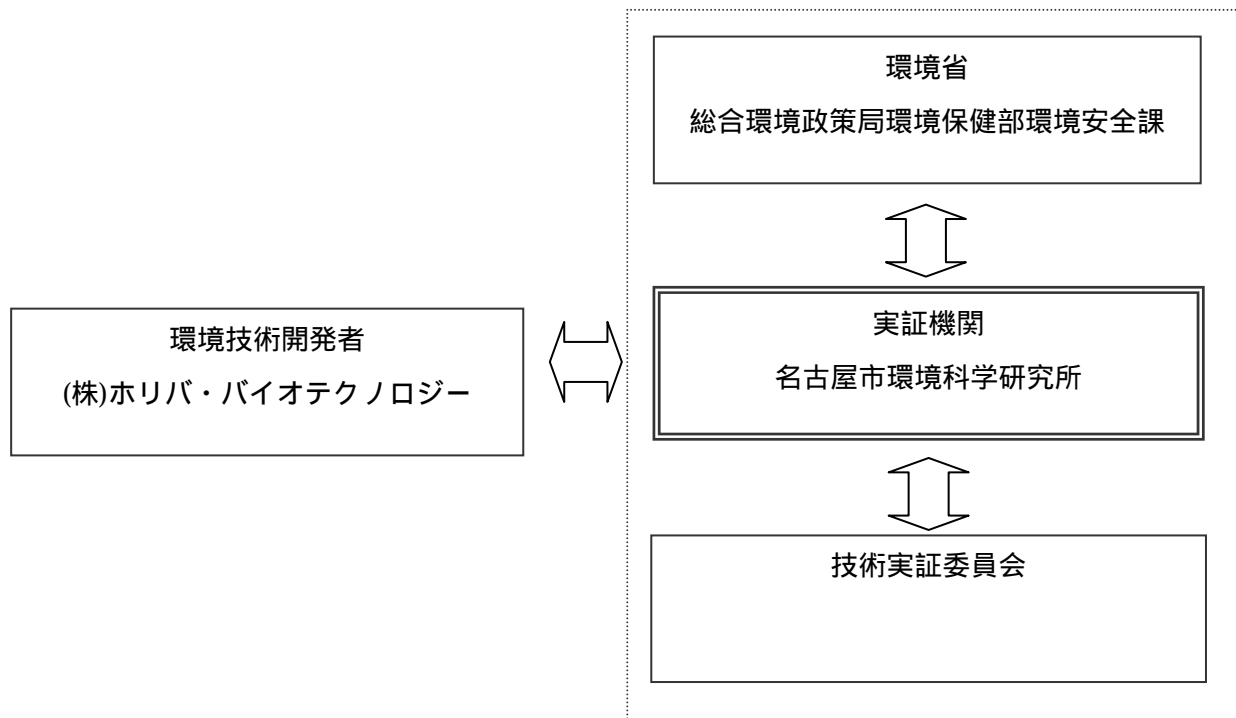


図 2.2 実証試験の実施体制

2.3 実証試験参加者の責任分掌

実証試験参加者とその責任分掌は、下表に示すとおりである。

表 2.3 実証試験参加者の責任分掌

実証試験 参加機関	責任分掌	参加者	
		部署	氏名
実証機関	実証試験の全体の統括責任者	所長	柴田 伸幸
	実証試験における ELISA 法の責任者	水質部長	須賀 博之
	実証試験における ELISA 法担当者のリーダー	大気騒音部 研究員	中島 寛則
	実証試験における ELISA 法担当者	水質部 主任研究員	小島 節子
	実証試験における機器分析の責任者	水質部長	須賀 博之
	実証試験における機器分析担当者のリーダー	水質部 主任研究員	小島 節子
	実証試験における機器分析担当者	大気騒音部 研究員	中島 寛則
	実証試験における精度・技術管理者	グイオキシ分析研 究センター長	加藤 光雄
	実証試験における精度管理担当者	水質部 主任研究員	安藤 良
	実証試験における精度管理担当者	グイオキシ分析研 究センター 主任研究員	大場 和生
環境技術開発者	実証対象製品全体の総括責任者	製造・開発部 部長	伊東 茂壽
	実証対象製品の提供	製造・開発部 次長	門脇 篤
	実証対象製品の取扱説明書等の提供	製造・開発部 部長	伊東 茂壽
	実証試験実施上の参考情報の提供	製造・開発部 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、申請者が開発したクロロタロニルに対する特異的なモノクローナル抗体を応用した、環境中(対象環境媒体：水質、底質、生物、その他)のクロロタロニル測定 ELISA キットである。

ELISA の原理は、競合反応(クロロタロニル濃度が高い試料では吸光度が低く、クロロタロニ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 3.2 実証対象製品のデータ(1)

項目	記入欄
製品名	クロロタロニル測定キットE
型番	E L 108-01
販売・製造元	株式会社 ホリバ・バイオテクノロジー
重量(g)	350g
価格(円)	105,000 円
分析対象物質	クロロタロニル
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(調製済/調製要)
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3ヶ月
同時測定数(最多)	46 試料
測定時間	2~3時間

表 3.2 実証対象製品のデータ (2)

項目	記 入 欄
1 . 基本的な性能	
測定範囲	0.15 ~ 1.5ppb (添付資料 1)
検出下限及び定量下限	
繰返し再現性	標準偏差 : 0.01 ~ 0.07 変動係数 : 5.0 ~ 5.4% (添付資料 2)
日間再現性	標準偏差 : 0.01 ~ 0.04 変動係数 : 3.6 ~ 5.6% (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 : 38.7% (フサライド)、1.7% (PCP) (添付資料 4)
その他	
2 . 実用的な性能	
回収特性	回収率 : 94.1 ~ 109.4% (添付資料 5)
測定精度等	
その他	
試験責任者	伊藤 茂壽
試験年月日	平成 17 年 8 月 31 日

4．実証試験のデザイン

4.1 実証試験の期間

実証試験の期間は、平成 17 年 10 月中旬～平成 17 年 11 月下旬とする。また、その期間のスケジュール（予定）は、下表に示すとおりである。

表 4.1 実証試験のスケジュール（予定）

	10月			11月				12月	2月
	1週	2週	4週	1週	2週	3週	4週	3週	
実証試験計画の策定									
対象技術の選定、計画書案作成									
実証試験計画書策定、承認									
実証試験の実施									
測定範囲の検討									
検出限界及び定量限界の検討									
繰返し再現性の検討									
日間再現性の検討									
期間再現性の検討									
プレート間再現性の検討									
交差反応性の検討									
回収特性の検討									
測定精度の検討									
監査の実施									
実証試験中間報告									
技術実証委員会の実施									
報告書の提出									

4.2 実証試験の内容

実証試験項目の内容は、表 4.2 のとおりである。

表 4.2 実証項目の内容

項目	内容
1．基本的な性能	
(1)測定範囲	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いた ELISA 測定値の変動等に基づき、数値的な設定の妥当性を実証する。
(2)検出下限及び定量下限	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の標準偏差に基づき、数値的な設定の妥当性を実証する。
(3)繰返し再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(4)日間再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて異なる条件（日付）での同一操作による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(5)期間再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて製造後一定期間経過した製品の操作による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(6)プレート間再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて異なるロットや異なるプレート間での ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(7)交差反応性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて類似物質別の ELISA 測定値の相違等に基づき、交差反応性を実証する。
2．実用的な性能	
(1)回収特性	提出書類の内容、環境試料を模擬し市販標準品で混合調製した試験用試料（濃度既知）を用いた ELISA 測定値の比較に基づき、回収特性を実証する。
(2)測定精度	環境試料（濃度未知）を用いた ELISA 測定値の変動や操作手順・操作方法の特徴等に基づき、測定精度、前処理妥当性、操作簡便性等による環境試料への適用性を実証する。

4.3 実証対象製品の受け入れと管理

(1) 実証対象製品 (ELISA キット) の受け入れ

受領の記録を ELISA キット管理表 (様式 4.3) に記入し、以下の事項を確認する。

管理表と ELISA キットの品名、数量が一致していること。

ELISA キットの搬送が適切に取り扱われていること。

ELISA キットに不適合又は疑義を発見したときは、適切な処置をとる。

(2) ELISA キットの管理

ELISA キットは、変質しないように、取扱説明書に記載された保管条件で適切に保管・管理する。

ELISA キットの分割を行う場合は、汚染や品質低下のない方法で行い、識別番号等必要な表示を行うとともに、分割の年月日その他必要な事項を管理表に記録する。

ELISA キット管理表 (様式 4.3)

受領年月日 _____ 時 分

番号 (管理番号) _____ - _____

メーカー名 _____

品名 _____

Lot . No. _____

搬入時確認事項

包装等に破損がない

保管温度 ()

搬入時の温度管理

使用期限

その他異常なし

保管場所 _____

保管温度 _____

担当者 _____

(移動・分割等の記録)

番号 (管理番号) _____ - _____

メーカー名 _____

品名 _____

Lot . No. _____

搬入時確認事項

包装等に破損がない

保管温度 ()

搬入時の温度管理

使用期限

その他異常なし

保管場所 _____

保管温度 _____

担当者 _____

(移動・分割等の記録)

4.4 実証試験の方法

基本的な性能試験及び実用的な性能試験において、以下の操作は共通である。

ア．製品の操作

製品の操作にあたっては、製品の取扱説明書を遵守するとともに、「品質管理マニュアル ELISA 法（クロロタロニル）」の試験操作手順（一般的な事項）に従って行う。

イ．検量線作成用標準溶液の調製

キットに付属する標準物質を用い、キットが指定する希釈濃度系列（以下、指定濃度系列）を作成する。

ウ．吸光度の測定

吸光度は、マイクロプレートリーダー（Labsystems 社製 Multiskan MS）で測定し、指定濃度系列及び各試験用試料溶液の吸光度とする。

エ．検量線の作成

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

オ．実測濃度の算出

前項で作成した検量線を用いて、各試験用試料溶液の吸光度から各実測濃度を算出する。

(1) 基本的な性能試験

実証対象製品の基本的な性能を検討するため、製品仕様の信頼性等の観点から市販標準品（以下、市販標準物質）で調製した試験用試料溶液を用いた実証試験を行う。

試験用試料溶液の調製

クロロタロニルの市販標準物質（和光純薬製 TPN 標準品（残留農薬試験用））を用いて、10%メタノールを希釈溶媒として、試験用試料溶液を調製する。

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

表 4.4.1 標準溶液指定系列及び試験用試料溶液

試験項目	物質名	試料溶液調製濃度 (µg/L)
標準溶液指定濃度系列	クロロタロニル	0, 0.15, 0.3, 0.6, 1.5
測定範囲 日間再現性 期間再現性 プレート間再現性	クロロタロニル	0, 0.15, 0.3, 0.6, 1.5
検出下限 1, 2 及び定量下限	クロロタロニル	0, 0.15
繰返し再現性	クロロタロニル	0.5
交差反応性	フサライド	0.01, 0.15, 0.5, 5.0, 10, 50
	PCP	0.1, 1.0, 10, 100, 500, 1000

測定範囲試験

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

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

検出下限及び定量下限試験

測定範囲の下限付近に調製した試験溶液を 8 回測定し、その実測濃度より標準偏差 (SD) を求める。求めた SD から 3SD 及び 10SD をそれぞれ検出下限 1 及び定量下限とし、申請データと比較検討する。これとは別に、指定濃度系列 0 濃度の吸光度を 10 回測定し、その標準偏差 (SD) から得られる 3SD 値 (吸光度) を 0 濃度の吸光度から差し引いた吸光度より、検量線を用いて換算濃度を求める。この濃度を検出下限 2 とし、検出下限 1 及び申請データと比較検討する。

繰返し再現性試験

測定範囲の直線域に調製した試料溶液を3重測定で8回測定し、得られた8個の実測濃度より平均値、標準偏差、変動係数を求める。

求めた変動係数(n=8)から、繰返し再現性について検討する。

日間再現性試験

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

期間再現性試験

同ロット(製造年月日と同じ)の2枚のプレートを用いて、1ヶ月以上離れた時期に「測定範囲試験」と同じ測定操作を行う。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、プレート間の比較から期間再現性について検討する。

プレート間再現性試験

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

交差反応性試験

クロロタロニル及び類似物質(フサライド、PCP)について調製した試料溶液で吸光度曲線(実測値は3重測定の平均値から求める)を描き、吸光度曲線から類似物質の50%発色阻害濃度を求める。(クロロタロニルの50%阻害濃度/類似物質の50%阻害濃度)×100(%)で交差率を求め、類似物質の交差反応性を検討する。

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

(2) 実用的な性能試験

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

回収特性試験

グラスファイバーフィルター（GFC：孔径 1.2 μ m）を用いて、河川水をろ過したろ液を原水とし、それに測定範囲の中央付近となるように市販標準物質（クロロタロニル）を添加するとともに、妨害物質としてフミン酸ナトリウムを一定濃度添加して、試験用試料溶液を調製する。試験用試料溶液の調製濃度（添加濃度）は、表 4.4.2 のとおりである。

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

表 4.4.2 試験用試料溶液

物質名	試料溶液調製濃度
分析対象物質：クロロタロニル	0.5 μ g/L
妨害物質：フミン酸ナトリウム	1, 5, 10, 50 mg/L

測定精度試験

3地点から採取した河川水について、グラスファイバーフィルターによるろ過及び固相カートリッジを用いた固相抽出法（キットの取扱説明書）による前処理を行って測定する。

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

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

5．データの品質管理

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

6．データの管理、分析、表示

(1) データの管理

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

(2) データの分析と表示

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

7．監査

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

8．実証試験の評価

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

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

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

付録1 技術の先進性、その他

1. 技術の先進性について

技術の先進性、特許・実用新案等の申請・取得状況、論文発表、受賞歴等があれば記入して下さい。

技術の先進性

クロロタロニルのイムノアッセイキットについては、ポリクロナール抗体を使ったチューブ法が販売されているが、今回申請するキットはモノクロナール抗体を使用した96穴マイクロタイタープレートであるので、常に一定品質の製品を供給することができ、また専用および汎用のいずれのプレートリーダーでの測定が可能である。

2. その他

クロロタロニルは「水道法水質管理目標設定項目の対象（目標値 0.05 mg/L 以下）」、「ゴルフ場で使用される農薬による水質汚濁の防止に係る暫定指導指針値（0.4 mg/L 以下）」が定められており、環境水での適応を確認するため、申請するものです。

付録2 環境技術者による性能試験結果

資料1

測定範囲の設定（クロロタロニル）

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 B_0 （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. 酵素標識物試薬の調製

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6 mLで溶解し、酵素標識物試薬とした。

1-3-3. 検量線溶液の調製

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

メタノールで段階希釈し、10 ppmの検量線用標準液を調製した。

下表に示すように検量線用標準液を2段階希釈して希釈列を調製した。

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

検量線溶液の調製（2段階希釈）

	1	2	3	4	5	6	7	8
検量線用標準液 (ppb)	1000	300	200	60	30	20	10	0.0
希釈後 (ppb)	10.0	3.0	2.0	0.6	0.3	0.2	0.1	0.0

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。

100 μ L/wellで各混合試液を抗体プレートに分注した。

25 1時間静置した。

吸引、洗浄を3回実施した。

100 μ L/wellで発色液を分注した。

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（450 nm）

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 B/Bo=0.8付近の濃度 (測定下限; L) として0.15ppb、及びB/Bo=0.2付近の濃度 (測定上限; として1.5 ppbを選定して、測定範囲上限および下限に設定した。

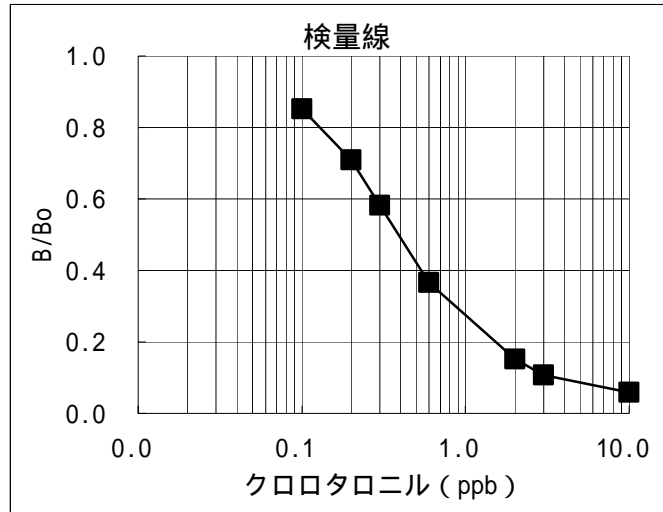


図1 . クロロタロニル検量線 (B/Bo表示)

資料2

再現性（クロロタロニル）

1. 目的

キットの再現性（同時、日間）を確認する。

2. 材料

クロロタロニル測定キット

きゅうり

1000 ppm 標準品メタノール溶液

3. 方法

3-1. 添加用標準液の調製

1000 ppm 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）	0.3	0.2	0.05

3-2. 測定試液の調製

農産物試料

磨碎 農産物を細断し、ミキサーでペースト状にした。

ペースト5 gを 50 mL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1 mL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	0.30	0.06	1.18	1.0
B	0.15	0.03	0.59	1.0
C	0.05	0.01	0.20	1.0

遠沈管のふたを閉め、よく振った。

メタノール24mLを添加した。

振とう機（110回/分）で30分間振とうした。

綿球を詰めたシリンジでろ過した。

ろ液を標準品を添加した農産物抽出液（85%MeOH相当）とした。

標準品を添加した農産物抽出液1 mLを1 mL瓶にとり、7.5 mL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 で保管してあるキット用抗体プレート、酵素標識物試薬および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 6 mL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 1.0 mL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、また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で分注した。

25 1時間静置した。

吸引、洗浄3回実施した。

発色液を100 μ L/well分注した。

発色反応 25 10分間静置した。

反応停止 反応停止液100 μ L/well分注した。

測定 (450nm)

測定機：スマートリーダー

3-5. 同時再現性

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

3-6. 日間再現性

同一測定者が日を変えて3回行った。(8重測定)

4. 結果

表2-1 同時再現性

	測定値 (ppb)		
	試料 A	試料 B	試料 C
1	0.25	0.63	1.26
2	0.26	0.72	1.26
3	0.28	0.72	1.20
4	0.27	0.68	1.09
5	0.28	0.70	1.26
6	0.25	0.69	1.16
7	0.29	0.66	1.28
8	0.25	0.64	1.26
平均	0.27	0.68	1.22
標準偏差	0.01	0.03	0.07
変動係数(%)	5.4	5.0	5.4

表2-2 日間再現性

	測定値 (ppb)		
	試料 A	試料 B	試料 C
1日目	0.27	0.68	1.22
2日目	0.25	0.63	1.14
3日目	0.24	0.70	1.16
平均	0.25	0.67	1.17
標準偏差	0.01	0.03	0.04
変動係数(%)	5.6	5.2	3.6

5. 考察

きゅうりのペースト試料にクロロタロニルを添加した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および2-2に示す通りで変動係数が各々5.0~5.4%及び3.6~5.6%であり、同時再現性および日間再現性は良好であった。

資料 3

保存安定性試験(クロロタロニル)

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

クロロタロニル測定キット：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6 mL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1.0 mLを添加、溶解して標準試液とした。

3-2. アッセイ

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

各混合試液を抗体プレートに100 μ L/well分注した。

25 1時間静置した。

吸引、洗浄3回実施した。

発色液を100 μ L/well分注した。

発色反応 25 10分間静置した。

反応停止 反応停止液100 μ L/well分注した。

測定 (450nm)

測定機：スマートリーダー

4. 結果

4-1. 1ロット目

表3-1 キットの保存安定性試験（1ロット目）

		保存日数			
		0	14	33	59
Bo	吸光度	1.512	1.444	1.464	1.415
	SD	0.025	0.027	0.025	0.035
	CV(%)	1.67	1.85	1.68	2.46
	相対値(%)	100.0%	95.5%	96.8%	93.6%
標準品L	吸光度	1.287	1.290	1.313	1.367
	B/Bo	0.85	0.89	0.90	0.97
	SD	0.037	0.036	0.011	0.019
	CV(%)	2.9	2.8	0.9	1.4
標準品H	吸光度	0.335	0.317	0.310	0.369
	B/Bo	0.22	0.22	0.21	0.26
	SD	0.009	0.014	0.008	0.014
	CV(%)	2.8	4.5	2.5	3.7
Boコントロール	吸光度	1.512	1.479	1.462	1.497
	SD	0.025	0.039	0.027	0.036
	CV(%)	1.7	2.6	1.9	2.4
	相対値(%)	100.0	97.8	96.6	99.0
試験用試料	測定値	0.40	0.45	0.45	0.43
	変動率		12.3%	12.0%	7.0%

4-2. 2ロット目

表3-2 キットの保存安定性試験（2ロット目）

		保存日数			
		0	14	33	59
Bo	吸光度	1.486	1.525	1.436	1.561
	SD	0.062	0.013	0.033	0.021
	CV(%)	4.2	0.9	2.3	1.4
	相対値(%)	100.0	102.6	96.6	105.0
標準品L	吸光度	1.259	1.430	1.320	1.346
	B/Bo	0.85	0.94	0.92	0.86
	SD	0.025	0.047	0.028	0.045
	CV(%)	2.0	3.3	2.1	3.3
標準品H	吸光度	0.311	0.350	0.332	0.395
	B/Bo	0.21	0.23	0.23	0.25
	SD	0.013	0.007	0.009	0.011
	CV(%)	4.1	1.9	2.8	2.7
Boコントロール	吸光度	1.486	1.573	1.462	1.579
	SD	0.062	0.016	0.020	0.010
	CV(%)	4.2	1.0	1.4	0.6
	相対値(%)	100.0	105.9	98.4	106.3
試験用試料	測定値	0.40	0.43	0.43	0.39
	変動率		7.1%	9.5%	-2.8%

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

0日目の測定値を基準とした変動率

5. 考察

表3-1～2の通り、8 保存59日経過で2ロットとも試料測定値の変動率は15%以内であり本キットは安定であった。なお本試験は続行中である。

交差反応性(クロロタロニル)

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

対象農薬の標準品

- 1 クロロタロニル
- 2 フサライド
- 3 PCP
- 4 テクロフタラム
- 5 テトラジホン
- 6 シアゾファミド
- 7 シモキサニル
- 8 ベノミル
- 9 プロシミドン
- 10 オキサジキシル
- 11 イプロジオン
- 12 *cis*-ペルメトリン
- 13 *trans*-ペルメトリン
- 14 オキシ銅
- 15 アゾキシストロピン
- 16 メタラキシル

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

3-2. キットの調製

4 保存キットを30分間25℃に静置した。

酵素標識物試薬に精製水6 mL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 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で分注した。

発色反応 25℃ 10分間静置した。

反応停止 反応停止液100 μL/wellで分注した。

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 (クロロタロニル) / 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(%)
クロロタロニル	100
フサライド	38.7
PCP	1.7
テクロフタラム	<0.1
テトラジホン	<0.1
シアゾファミド	<0.1
シモキサニル	<0.1
ベノミル	<0.1
プロシミドン	<0.1
オキサジキシル	<0.1
イプロジオン	<0.1
<i>cis</i> -ペルメトリン	<0.1
<i>trans</i> -ペルメトリン	<0.1
オキシ銅	<0.1
アゾキシストロピン	<0.1
メトラキシル	<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3に示す通りで、対象農薬のうちフサライドで38.7%、PCPで1.7%である以外は交差反応性は認めなかった。

添加回収試験（クロロタロニル）

1. 目的

農産物に添加したクロロタロニルの回収率を確認する。

2. 材料

クロロタロニル測定キット

きゅうり

1000 ppm 標準品メタノール溶液

3. 方法

3-1. 添加用標準液の調製

1000 ppm 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)	0.3	0.15	0.05

3-2. 測定試液の調製

農産物試料

磨碎：農産物を細断し、ミキサーでペースト状にした。

ペースト5 gを 50 mL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1 mL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 ppm	ホモジネート 中農薬濃度 ppm	抽出・希 釈後濃度 ppb	添加量 mL
A	0.30	0.06	1.18	1.0
B	0.15	0.03	0.59	1.0
C	0.05	0.01	0.20	1.0

遠沈管のふたを閉め、よく振った。

メタノール24mLを添加した。

振とう機（110回/分）で30分間振とうした。

綿球を詰めたシリンジでろ過した。

ろ液を標準品を添加した農産物抽出液(85%MeOH相当)とした。

標準品を添加した農産物抽出液1 mLを10 mL瓶にとり、7.5 mL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6 mL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 1.0 mLを添加、溶解して標準試液とした。

3-4. アッセイ

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

各混合試液を抗体プレートに100 μ L/well分注した。

25 1時間静置した。

吸引、洗浄3回実施した。

発色液を100 μ L/wellで分注した。

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で分注した。

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 (%)
0.06	0.05	90.1	98.8 \pm 7.7
	0.06	101.3	
	0.06	104.9	
0.03	0.03	97.2	94.0 \pm 2.8
	0.03	93.0	
	0.03	91.9	
0.01	0.01	106.9	109.4 \pm 2.5
	0.01	111.9	
	0.01	109.3	

5. 考察

きゅうりのペーストにクロロタロニ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4のとおり回収率は94.0~109.4%と良好な値を示した。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) \times 100

スマートアッセイ シリーズ クロロタロニル測定キット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、抗クロロタロニル抗体の特異的応答を利用した酵素免疫測定法（Enzyme Linked Immunosorbent Assay ; ELISA）によるクロロタロニ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、環境水中のクロロタロニルを直接競合 ELISA 法で測定するものです。

クロロタロニ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、クロロタロニル（標準溶液または試料溶液）とクロロタロニ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クロロタロニル濃度が高いほど低下します。標準溶液のクロロタロニル濃度とその吸光度の関係からクロロタロニル濃度を求めます。

3. キットの特徴

- 1) **高感度** - クロロタロニルを 0.15 ~ 1.5 ppb の範囲で測定できます。
- 2) **簡便** - 機器分析法に比べ試料の煩雑な前処理を必要とせず、簡易な操作で測定できます。
- 3) **迅速** - 前処理が簡単なため、短時間で多くの試料を同時に測定できます。
- 4) **低コスト** - 高価な機器を必要とせず、測定場所を特に選ばないため、コストを安くできます。

4. キットの構成

キットの構成は、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
クロロタロニル抗体プレート	8 ウェル×12 列 (96 ウェル)	乾燥品	1 枚
クロロタロニル標準試薬 C1 (0.15 ppb)	1 mL	凍結乾燥品	2 バイアル
クロロタロニル標準試薬 C2 (0.3 ppb)	1 mL	凍結乾燥品	2 バイアル
クロロタロニル標準試薬 C3 (0.6 ppb)	1 mL	凍結乾燥品	2 バイアル
クロロタロニル標準試薬 C4 (1.5 ppb)	1 mL	凍結乾燥品	2 バイアル
クロロタロニル酵素標識物試薬	6 mL	凍結乾燥品	2 バイアル
洗浄試薬 (10 倍濃縮)	50 mL	液体	1 バイアル
発色試薬	13 mL	液体	1 バイアル
発色停止試薬	13 mL	液体	1 バイアル
プレートシール			1 枚

5. 測定に必要な試薬・器具・装置類

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

6. 溶液の調製

- (1) クロロタロニル抗体プレート
そのまま用います。
- (2) クロロタロニル標準溶液
クロロタロニル標準試薬 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、それぞれクロロタロニル標準溶液 C1 から C4 とします。溶解後の濃度は、それぞれ 0.15、0.3、0.6 および 1.5 ppb です。
- (3) クロロタロニル酵素標識物溶液
酵素標識物試薬に精製水 6 mL を加えて溶解し、クロロタロニ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%溶液を調製し、試料溶液とします。

混合液の調製

クロロタロニル標準溶液または試料溶液 150 μL をマイクロピペットで試験管に取り、それぞれにクロロタロニル酵素標識物溶液 150 μL をマイクロピペットで加えて混合し、標準混合液または試料混合液とします。

競合反応

抗体プレートのウェルに、標準混合液または試料混合液 100 μL ずつをマイクロピペット(50~200 μL 用)で分注します。ついで、ストリップの使用ウェルに合わせて切断したプレートシールを貼り、室温(15~25 °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 μL で3回洗浄します。
ウェルの底に洗浄溶液が残っていないことを確認して下さい。
測定の迅速性と定量精度を高めるため、専用の洗浄機のご使用をお勧めします。

発色反応、発色反応停止

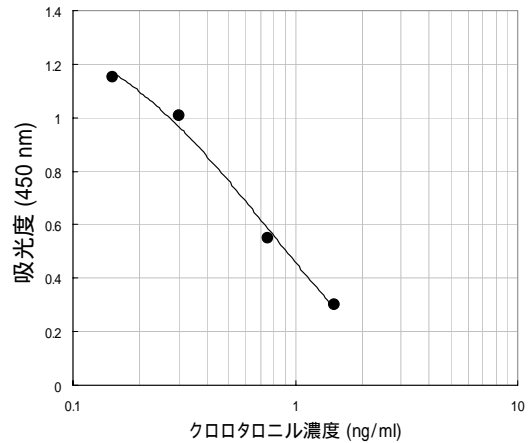
マイクロピペット(50~200 μL 用)で発色試薬 100 μL を加えて室温(15~25 °C)で10分間反応させた後、発色停止試薬 100 μL をマイクロピペット(50~200 μL 用)で添加して下さい。
発色試薬を加えると時間と共に青色に、発色停止試薬を加えると同時に黄色に呈色します。
各ウェルの発色反応時間が一定になるように注意して下さい。

吸光度測定

波長 450 nm における吸光度を、マイクロプレートリーダーにより測定します。
発色停止後、15分以内に吸光度を測定して下さい。
専用のマイクロプレートリーダー“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行われます。

2) 試料中のクロロタロニル濃度の計算

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クロロタロニル濃度(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。



$$Y = -0.32 + (1.46 + 0.32) / (1 + 10^{(\log X - \log 0.78)})$$

図1 回帰曲線および回帰式の例

8. 他農薬との交差反応性

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 各種農薬との交差反応性

化合物名	代表的商品名	交差反応性 (%)
クロロタロニル	ダコニール	100
フサライド	ラブサイド	38.7
PCP	登録失効	1.7
テクロフタラム	シハラゲン	<0.1
テトラジホン	テデオ	<0.1
シアゾファミド	ランマン	<0.1
シモキサニル	(単剤なし)	<0.1
ベノミル	ベンレート	<0.1
プロシミドン	スミレックス	<0.1
オキサジキシル	(単剤なし)	<0.1
イブロジオン	ロブラール	<0.1
cis、trans-ベルメトリン	アディオ	<0.1
オキシ銅	キノンドー	<0.1
アゾキシストロピン	アミスター	<0.1
メタラキシル	リドミル	<0.1

9. 貯法・有効期間

貯法：遮光して2~8 °Cに保存します。
有効期間：パッケージに表示してあります。

10. 注意事項

使用前に、取扱説明書をよくお読みいただき、注意事項をお守りください。

1) 一般的な注意事項

本キットは、食品衛生・環境等に関わる自主検査用です。測定結果の判断と運用は、すべてお客様自身の責任で行ってください。
責任ある管理者の指導のもとに、保護手袋、保護メガネ等を着用して安全に取り扱って下さい。
吸飲したり、皮膚と接触したりすると有害な試薬類が含まれています。身体に異常を感じた場合は、直ちに医師の手当てを受けてください。

保管・廃棄する場合には、衛生面、環境面に十分配慮し、法規を遵守してください。クロロタロニルを含む廃液、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。本キットを一度に使い切らなかった場合は、各容器を密封し、取扱説明書と共に保管してください。

2) 測定操作上の注意事項

本キットは、使用 30 分程前に冷蔵庫から取出し、室温に戻してからご使用ください。

異なるロットの試薬を組合わせて使用しないでください。

マイクロプレートは、各 8 ウェルずつのストリップタイプになっていますので、必要なウェル数のみを用意し、残りはラミネート袋に戻し、密封して冷蔵保存してください。また、抗体プレートを取扱う際は、裏面を汚さないようにしてください。

正確な分析を行うため、試薬の溶解・希釈操作は可能な限り正確に行ってください。また、各反応時間を厳守してください。

検量線は、測定ごとに作成してください。

測定は少なくとも 2 重測定で行ってください。

測定は、検量線範囲内の濃度（0.15 ~ 1.5 ppb）で行って下さい。1.5 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。

競合反応後の洗浄ではウェルの底に洗浄溶液が残っていないことを確認して下さい。

発色および発色停止反応時の各ウェルの反応時間が一定になるように調整してください。

本キットは、フサライドと 38.7%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>