

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》ポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE) E L I S A キット（マグネティック・パーティクル） |

平成18年3月

名古屋市

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)

名古屋市環境科学研究所

所長 柴田 伸幸

(要約)

| | |
|-----------|---|
| 製品名称 | ポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE)ELISAキット (マグネティック・パーティクル) |
| 環境技術開発者 | 日本エンバイロケミカルズ 株式会社 |
| 実証機関 | 名古屋市 |
| 対象物質 | PBDE - 47 |
| 実証試験の実施期間 | 平成 17 年 11 月 24 日 ~ 平成 18 年 2 月 13 日 |

1. 実証対象技術の概要

この実証対象製品は、ポリ臭化ジフェニルエーテル (PBDE) に対する特異的なポリ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) の PBDE 測定 ELISA キットである。

ELISA の原理は、競合反応 (PBDE 濃度が高い試料では吸光度が低く、PBDE 濃度が低い試料では吸光度が高い) で、マグネティック・パーティク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)キット間再現性 | 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キット間での 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 | ポリ臭化ジフェニルエーテル（PBDE）ELISA キット（マグネティック・パーティクル） |
| 型番 | 《販売元コード》未定（製造元コード：PN500090） |
| 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（キット一式、g） | 1,300g |
| 価格（円） | 要照会 |
| 分析対象物質 | ポリ臭化ジフェニルエーテル |
| 対象環境媒体 | 水質・底質・生物・その他（土壌・穀物）水試料以外は抽出操作が必要。 |
| 利用用途 | 環境水（地下水、表流水、飲料水）、土壌、底質、魚類細胞、等のモニタリング |
| 標準試薬・種類 | 付属（調製済 / 調製要）PBDE-47 0,0.025,0.05,0.1,0.5,1.0ppb 各 50%メタノール溶液 |
| 操作環境（室温） | 15 ~ 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（最多） | 40 試料（n=2 で 1 キット使用時） |
| 測定時間 | 1.1 時間（固相抽出等の試料の前処を除く） |

4. 実証試験結果の概要

| 項目 | 結果概要 | |
|----------------|--|--|
| 実証機関 | 名古屋市環境科学研究所 | |
| 製品名称 | ポリ臭化ジフェニルエーテル (PBDE) ELISA キット (マグネティック・パーティクル) | |
| 環境技術開発者 | 日本エンバイロケミカルズ株式会社 | |
| 対象物質 | ポリ臭化ジフェニルエーテル-47 | |
| 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 11 月 24 日 ~ 平成 18 年 2 月 13 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 0.025 ~ 1.0 µg/L での相対値： 100 ~ 126%、CV：1.7 ~ 10.3% | 0.025 ~ 1.0 µg/L |
| 検出下限 及び定量下限 | 調整濃度 0.025 µg/L の SD より求めた検出下限 (3SD)： 検出下限 1)：0.0033 µg/L、定量下限 (10SD)：0.011 µg/L 0 濃度より求めた検出下限 (検出下限 2)：0.0053 µg/L | 検出下限：0.020 µg/L 定量下限：0.025 µg/L |
| 繰返し再現性 | 調製濃度 0.10 µg/L での 標準偏差：0.0017 CV%：1.7% | 標準偏差：0.006 CV%：2.74% (測定濃度：0.2 µg/L) |
| 日間再現性 | 調製濃度 0.025 ~ 1.0 µg/L での 標準偏差：0.0017 ~ 0.25 CV%：1.6 ~ 20.6% | 標準偏差：0.0021 CV%：2.2% (測定濃度：0.10 µg/L) |
| 期間再現性 | 調製濃度 0.025 ~ 1.0 µg/L での 0 ヶ月の標準偏差：0.003 ~ 0.064 CV%：1.7 ~ 10.3% 1 ヶ月の標準偏差：0.001 ~ 0.408 CV%：1.0 ~ 26.8% | 標準偏差：0.0045 CV%：4.74% (測定濃度：0.10 µg/L) |
| キット間再現性 | 調製濃度 0.025 ~ 1.0 µg/L での 標準偏差：0.0009 ~ 0.055 CV%：1.7 ~ 12.2% | 標準偏差：0.02 CV%：3.89% (測定濃度：0.50 µg/L) |
| 交差反応性 | 交差反応率： PBDE-99：88.1% PBDE-28：10.3% PBDE-100：3.83% | 交差反応率： PBDE-99：90.0% PBDE-28：15.0% PBDE-100：2.45% |
| 2) 実用的な性能 | | |
| 回収特性 | 対象物質を終濃度 0.10 µg/L となるよう PBDE-47 を添加した河川水に、妨害物質としてフミン酸ナトリウム 0 ~ 50 mg/L を添加した場合の回収率 105 ~ 114% | 回収率 90.2 ~ 108.3% (検体：水道原水、井戸水、池、配水路) |
| 測定精度等 | 3 地点の河川水について ELISA 法、GC/MS 法とも検出されず (ELISA: 0.0033 µg/L 以下、GC/MS: 0.0005 µg/L 以下) < PBDE-47 添加試験 > 原水に 0.04 µg/L 添加 (ELISA 測定時濃度 0.02 µg/L) ELISA 法：回収率 91.8 ~ 116%、CV% 2.58 ~ 9.7% GC/MS 法：回収率 51.3 ~ 75.4%、CV% 0.93 ~ 12.2% | 記述なし |
| その他 | | 魚類細胞測定時の GC/MS との 相関 R=0.872 |

結果の検討と考察

1) 製品性能の信頼性

実証試験で実施した基本性能7項目の全ての結果から、0.025～1.0 μ g/Lの濃度範囲において、申請者製品データと比較して、ほぼ妥当な製品性能の信頼性を確認した。

2) 一般環境モニタリングでの実用性

河川水に定量下限値付近の低濃度(0.04 μ g/L)のPBDE-47を添加した実験において、良好な回収率を示した。環境水中のPBDE濃度は、低濃度であるため、適切な前処理を行えば実用化が可能である。また、底質・母乳などのPBDEの検出が報告されている媒体での知見を蓄積することにより、より有効な測定キットと期待される。

3) 製品操作等の簡便性

本キットの利点としては、迅速に(2時間:前処理を含まない)多試料(13試料:3重測定)の環境試料を同時に定量することが可能な点、マイクロプレートリーダーを必要とせず吸光度計があれば測定可能である点などが挙げられる。一方、欠点としては、吸光度測定に時間を要することから、多検体をこなす場合、酵素基質添加から吸光度測定に至るまで、厳密な時間管理を行わないと真値からのずれが大きくなる恐れがある点が挙げられる。

また、キット付属取扱説明書は、英語で書かれているが、メーカーのホームページには、取扱ビデオ映像があるので、間違えることなく実施可能である。

(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 | 6 |
| 3.3 実証試験実施場所 | 6 |
| (1) E L I S A 法 | 6 |
| (2) 機器分析法 | 6 |
| 3.4 実証試験実施期間 | 6 |
| 4. 試験方法 | 7 |
| 4.1 共通して行う試験操作 | 7 |
| (1) 製品の操作 | 7 |
| (2) 検量線作成用標準溶液の調製 | 7 |
| (3) 吸光度の測定 | 7 |
| (4) 検量線の作成 | 7 |
| (5) 実測濃度の算出 | 7 |
| 4.2 基本的な性能 | 8 |
| (1) 測定範囲 | 8 |
| (2) 検出下限及び定量下限 | 9 |
| (3) 繰返し再現性 | 10 |
| (4) 日間再現性 | 11 |
| (5) 期間再現性 | 12 |
| (6) キット間再現性 | 13 |
| (7) 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 | 17 |
| 5.1 基本的な性能 | 17 |
| (1) 測定範囲 | 17 |

| | |
|------------------|----|
| (2)検出下限及び定量下限 | 19 |
| (3)繰返し再現性 | 21 |
| (4)日間再現性 | 23 |
| (5)期間再現性 | 27 |
| (6)キット間再現性 | 30 |
| (7)交差反応性 | 34 |
| 5.2 実用的な性能 | 39 |
| (1)回収特性 | 39 |
| (2)測定精度等 | 40 |
| 6. 実証試験結果の検討と考察 | 45 |
| (1)製品性能の信頼性 | 45 |
| (2)一般モニタリングでの実用性 | 45 |
| (3)製品操作の簡便性 | 45 |

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 1.1.1 実証対象製品のデータ

| 項目 | 記入欄 |
|------------|---|
| 技術・製品の名称 | ポリ臭化ジフェニルエーテル (PBDE) ELISA キット (マグネティック・パーティクル) |
| 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 | 名古屋市環境科学研究所 所長 柴田 伸幸 |
| 実証試験実施場所 | 〒457-0841 名古屋市南区豊田 5-16-8 名古屋市環境科学研究所 |
| 実証試験実施期間 | 平成17年11月24日～平成18年2月13日 |
| 製品名 | ポリ臭化ジフェニルエーテル (PBDE) ELISA キット (マグネティック・パーティクル) |
| 型番 | 《販売元コード》未定 (製造元コード: PN500090) |
| 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) | 1,300 g |
| 価格 (円) | 未定 |
| 分析対象物質 | ポリ臭化ジフェニルエーテル |
| 対象環境媒体 | 水質 底質 生物 ・その他 () 水試料以外は抽出操作が必要。 |
| 利用用途 | 環境水 (地下水、表流水、飲料水)、土壌・底質、魚類細胞、等のモニタリング |
| 標準試薬・種類 | 付属 調製済 / 調製要) PBDE-47 0,0.025,0.05,0.1,0.5,1.0µg/l 各 50% メタノール溶液 |
| 操作環境 (室温) | 15 ~ 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 (最多) | 40 試料 (n=2 で 1 キット使用時) |
| 全体測定時間 | 1.1 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

申請データ：0.025～1.0 μ g/L

実証データ：0.025～1.0 μ g/L (0.025,0.05,0.10,0.50,1.0 μ g/Lにて実施)

(変動係数：1.7%～10.3%、相対値%：100～126%)

検出下限及び定量下限

申請データ：検出下限 0.020 μ g/L 定量下限 0.025 μ g/L

実証データ：検出下限 1 0.0033 μ g/L 定量下限 0.011 μ g/L

検出下限 2 0.0053 μ g/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。

繰返し再現性

申請データ：標準偏差 0.006 変動係数 2.74%

実証データ：標準偏差 0.0017 変動係数 1.7% (0.10 μ g/Lにて実施)

日間再現性

申請データ：標準偏差 0.0021 変動係数 2.2%

実証データ：標準偏差 0.0017～0.25 変動係数 1.6～20.6%

(測定濃度 0.025～1.0 μ g/Lにて実施)

期間再現性

申請データ：標準偏差 0.0045 変動係数 4.74%

実証データ：0ヶ月 標準偏差 0.003～0.064 変動係数 1.7～10.3%

1ヶ月 標準偏差 0.001～0.408 変動係数 1.0～26.8%

(測定濃度 0.025～1.0 μ g/Lにて実施)

キット間再現性

申請データ：標準偏差 0.02 変動係数 3.89%

実証データ：標準偏差 0.0009～0.055 変動係数 1.7～12.2%

(測定濃度 0.025～1.0 μ g/Lにて実施)

交差反応性

申請データ：PBDE-99:90.0% PBDE-28:15.0% PBDE-100:2.45%

実証データ：PBDE-99:88.1% PBDE-28:10.3% PBDE-100:3.83%

(PBDE-99:0.025 ~ 1.0 μ g/L、PBDE-28:0.05 ~ 5.0 μ g/L、
PBDE-100:0.1 ~ 50 μ g/L にて実施)

(2) 実用的な性能

回収特性

申請データ：回収率 90.2 ~ 108.3% (0.0625 ~ 0.5 μ g/L にて実施)

(試料：水道原水、井戸水 = 飲料水、池、配水路から採水)

実証データ：回収率 105 ~ 114% (0.10 μ g/L にて実施)

(試料：河川水にフミン酸ナトリウムを 0 ~ 50mg/L 添加)

測定精度等

申請データ：記述なし

実証データ：3 地点の河川水を採取し、ELISA 法、GC/MS 法にて、定量したところ、
いずれの試料でも検出されなかった。したがって、PBDE-47 を 0.04
 μ g/L となるように各試料に添加し、ELISA 法、GC/MS 法により定量
を試みた。

その結果、ELISA 法での回収率は、91.8 ~ 116%(CV%:2.5 ~ 9.7%)と
なった。

GC/MS での回収率は、51.3 ~ 75.4%(CV:0.93 ~ 12.2%)となった。

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 : 日本エンバイロケミカルズ株式会社
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

この実証対象製品は、ポリ臭化ジフェニルエーテル (PBDE) に対する特異的なポリ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) の PBDE 測定 ELISA キットである。

ELISA の原理は、競合反応 (PBDE 濃度が高い試料では吸光度が低く、PBDE 濃度が低い試料では吸光度が高い) で、マグネティック・パーティクルを使用したキットである。

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 2.3.1 製品データ

| 項目 | 記入欄 |
|-----------|--|
| 製品名 | ポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE)ELISA キット (マグネティック・パーティクル) |
| 型番 | 《販売元コード》未定(製造元コード:PN500090) |
| 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) | 1,300g |
| 価格(円) | 未定 |
| 分析対象物質 | ポリ臭化ジフェニルエーテル |
| 対象環境媒体 | 水質・底質・生物・その他() 水試料以外は抽出操作が必要。 |
| 利用用途 | 環境水(地下水、表流水、飲料水)、土壌・底質、魚類細胞、等のモニタリング |
| 標準試薬・種類 | 付属(調製済/調製要) PBDE-47 0, 0.025, 0.50, 0.1, 0.5, 1.0ppb 各 50%メタノール溶液 |
| 操作環境(室温) | 15 ~ 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(最多) | 40 試料(n=2 で 1 キット使用時) |
| 測定時間 | 1.1 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：名古屋市環境局公害対策課長 加藤 明
 所属部署：環境局公害対策課 有害物質対策係
 担当者氏名：中村 清志
 住 所：〒460-0001 名古屋市中区三の丸三丁目1番1号
 電話番号：052-972-2677
 F A X 番号：052-972-4155
 e-mail アドレス：a2677@kankyokyoku.ci ty.nagoya.lg.jp

3.2 実証試験実施者

実施責任者：名古屋市環境科学研究所 所長 柴田 伸幸

試験担当者氏名：（ELISA法）水質部 研究員 山守 英朋

（機器分析）水質部 主任研究員 渡辺 正敏

ダイオキシン分析研究センター

研究員 鈴木 直喜

連絡窓口：水質部 主任研究員 小島 節子

住 所：〒457-0841 名古屋市南区豊田五丁目 16 番 1 号

電話番号：052-692-8481

F A X 番号：052-692-8483

e-mail アドレス：kojima@nagoyakankaken.office.to

3.3 実証試験実施場所

(1) E L I S A 法

名古屋市環境科学研究所 水質部

(2) 機器分析法

名古屋市環境科学研究所 水質部・ダイオキシン分析研究センター

3.4 実証試験実施期間

平成17年11月24日～平成18年2月13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」及び「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、E L I S Aに係わる品質管理システムの試験操作手順（一般的な事項）に従って行った。

本キットは、E L I S Aプレートのかわりに、試験管を用い行うため、試験に先だっ
て、試験管をキムワイプなどでよくふき取った後、吸光度を測定し、可能な限り吸光
度を揃える目的で、測定方向を規定するためのマーキングを施し、450nmにおける吸
光度変化の最大幅を0.010として実施した^{注1}。また、吸光度測定までの全ての操作で、
ストップウォッチを用い一定間隔で行った^{注2}。

(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、ハンディーフォトメーター（SCETI 製 MODEL6+）で測定し、検量線作成用
標準溶液及び各試験用試料溶液の吸光度とした。

(4) 検量線の作成

試験管毎に波長 450nm で吸光度を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パラメーターによりロジスティック曲線を近似した標準曲線を作成
した。（検量線作成用の解析ソフト：Labsystem 社製 GENESIS-LITE）

(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。

注1) 試験管毎の汚れおよびガラス肉厚の差によるセル誤差が懸念されたので実施した
が、後の解析において、0.5 μ g/L以下の濃度では、箱から出したそのままの試験
管を用いた場合のセル差による定量値への影響は、最大でも10%以内と問題とな
るレベルではなかったことと、1.0 μ g/Lでは、43%の定量誤差を示したが、マーキ
ングを行ったものでも、23%の誤差があり、1.0 μ g/Lでは、他の誤差要因の影響が
考えられた。

注2) 本キットは反応停止から、15分以内に吸光度の測定を行うことを推奨している。
したがって、多検体を同時に試験する場合、発色基質添加の操作より吸光度測定
の操作まで、一定間隔で行わなければ、全検体を15分以内に吸光度測定を行うこ
とが不可能となる。

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 | ポリ臭化ジフェニルエーテル |
| 対象製品名 | ポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE) ELISA キット(マグネティック・パーティクル) |
| 製品番号 | ロット番号: 5 J 1 7 5 6 |
| 製造年月日 | 平成17年10月 |
| 測定範囲(製品仕様) | 0.025 ~ 1.0 µg/L |
| 試験日時 | 平成17年11月30日 10:30 ~ 12:30 |
| 試験場所 | 名古屋市環境科学研究所 防止技術実験室 |
| 試験時室内温度 | 20 ± 1 |
| 使用した市販標準品 | 物質名: PBDE-47 試薬会社名: AccuStandard INC. 製品番号: BDE-047S ロット番号: B2090083 |
| 検量線用ソフト名 | GENESIS-Lite (Labsystems 社製) |
| 試験機関・担当者 | 名古屋市環境科学研究所 水質部 研究員 山守 英朋 |

試験操作

実証試験計画書に従い実施した。

(2) 検出下限及び定量下限

試験条件

本製品の検出下限及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 検出下限及び定量下限の試験条件

| 項目 | 内容 |
|------------|---|
| 実証項目 | 基本的な性能・検出下限及び定量下限(標準試料試験) |
| 対象物質 | ポリ臭化ジフェニルエーテル |
| 対象製品名 | ポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE) ELISA キット(マグネティック・パーティクル) |
| 製品番号 | ロット番号: 5 J 1 7 5 6 |
| 製造年月日 | 平成17年10月 |
| 測定範囲(製品仕様) | 0.025 ~ 1.0 µg/L |
| 試験日時 | 平成17年11月29日 9:55 ~ 12:20 平成17年11月29日 13:30 ~ 15:45 |
| 試験場所 | 名古屋市環境科学研究所 防止技術実験室 |
| 試験時室内温度 | 20 ± 1 20 ± 1 |
| 使用した市販標準品 | 物質名: PBDE-47 試薬会社名: AccuStandard INC. 製品番号: BDE-047S ロット番号: B2090083 |
| 検量線用ソフト名 | GENESIS-Lite (Labsystems 社製) |
| 試験機関・担当者 | 名古屋市環境科学研究所 水質部 研究員 山守 英朋 |

試験操作

実証試験計画書に従い実施した。

(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 | ポリ臭化ジフェニルエーテル |
| 対象製品名 | ポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE) ELISA キット(マグネティック・パーティクル) |
| 製品番号 | ロット番号: 5 J 1 7 5 6 |
| 製造年月日 | 平成17年10月 |
| 測定範囲(製品仕様) | 0.025 ~ 1.0 µg/L |
| 試験日時 | 平成17年12月8日 10:00 ~ 12:30 |
| 試験場所 | 名古屋市環境科学研究所 防止技術実験室 |
| 試験時室内温度 | 23 ± 1 |
| 使用した市販標準品 | 物質名: PBDE-47 試薬会社名: AccuStandard INC. 製品番号: BDE-047S ロット番号: B2090083 |
| 検量線用ソフト名 | GENESIS-Lite (Labsystems 社製) |
| 試験機関・担当者 | 名古屋市環境科学研究所 水質部 研究員 山守 英朋 |

試験操作

実証試験計画書に従い実施した。

(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 | ポリ臭化ジフェニルエーテル |
| 対象製品名 | ポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE) ELISA キット(マグネティック・パーティクル) |
| 製品番号 | ロット番号: 5 J 1 7 5 6 |
| 製造年月日 | 平成17年10月 |
| 測定範囲(製品仕様) | 0.025 ~ 1.0 µg/L |
| 試験日時 | 平成17年12月1日 10:00 ~ 12:20 平成17年12月5日 14:00 ~ 17:00 平成17年12月7日 9:50 ~ 12:10 |
| 試験場所 | 名古屋市環境科学研究所 防止技術実験室 |
| 試験時室内温度 | 22 ± 2 21 ± 1 23 ± 1 |
| 使用した市販標準品 | 物質名: PBDE-47 試薬会社名: AccuStandard INC. 製品番号: BDE-047S ロット番号: B2090083 |
| 検量線用ソフト名 | GENESIS-Lite (Labsystems 社製) |
| 試験機関・担当者 | 名古屋市環境科学研究所 水質部 研究員 山守 英朋 |

試験操作

実証試験計画書に従い実施した。

(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 | ポリ臭化ジフェニルエーテル |
| 対象製品名 | ポリ臭化ジフェニルエーテル (PBDE) ELISA キット (マグネティック・パーティクル) |
| 製品番号 | ロット番号 : 5 J 1 7 5 6 |
| 製造年月日 | 平成 1 7 年 1 0 月 |
| 測定範囲 (製品仕様) | 0 . 0 2 5 ~ 1 . 0 μ g/L |
| 試験日時 | 平成 1 7 年 1 1 月 3 0 日 1 0 : 3 0 ~ 1 2 : 3 0 平成 1 7 年 1 2 月 2 7 日 1 3 : 4 5 ~ 1 6 : 1 0 |
| 試験場所 | 名古屋市環境科学研究所 防止技術実験室 |
| 試験時室内温度 | 2 0 \pm 1 2 0 \pm 1 |
| 使用した市販標準品 | 物質名 : PBDE-47 試薬会社名 : AccuStandard INC. 製品番号 : BDE-047S ロット番号 : B2090083 |
| 検量線用ソフト名 | GENESIS-Lite (Labsystems 社製) |
| 試験機関・担当者 | 名古屋市環境科学研究所 水質部 研究員 山守 英朋 |

試験操作

実証試験計画書に従い実施した。

(6) キット間再現性

試験条件

本製品のキッ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 キット間再現性の試験条件

| 項目 | 内容 |
|------------|--|
| 実証項目 | 基本的な性能・キット間再現性(標準試料試験) |
| 対象物質 | ポリ臭化ジフェニルエーテル |
| 対象製品名 | ポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE) ELISA キット(マグネティック・パーティクル) |
| 製品番号 | ロット番号: 5 J 1 7 5 6 (A・B) および 5 J 1 7 5 6 a (C) |
| 製造年月日 | A・B 平成17年10月 C 平成17年9月 |
| 測定範囲(製品仕様) | 0.025 ~ 1.0 µg/L |
| 試験日時 | A 平成17年11月30日 8:30 ~ 10:30 B 平成17年11月30日 10:30 ~ 12:30 C 平成17年11月30日 13:30 ~ 15:30 |
| 試験場所 | 名古屋市環境科学研究所 防止技術実験室 |
| 試験時室内温度 | A 20 ± 1 B 20 ± 1 C 20 ± 1 |
| 使用した市販標準品 | 物質名: PBDE-47 試薬会社名: AccuStandard INC. 製品番号: BDE-047S ロット番号: B2090083 |
| 検量線用ソフト名 | GENESIS-Lite (Labsystems 社製) |
| 試験機関・担当者 | 名古屋市環境科学研究所 水質部 研究員 山守 英朋 |

試験操作

実証試験計画書に従い実施した。

(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 | ポリ臭化ジフェニルエーテル |
| 対象製品名 | ポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE) ELISA キット(マグネティック・パーティクル) |
| 製品番号 | ロット番号: 5 J 1 7 5 6 |
| 製造年月日 | 平成17年10月 |
| 測定範囲(製品仕様) | 0.025 ~ 1.0 µg/L |
| 試験日時 | 平成17年12月5日 10:00 ~ 12:20 平成17年12月5日 14:00 ~ 17:00 |
| 試験場所 | 名古屋市環境科学研究所 防止技術実験室 |
| 試験時室内温度 | 21 ± 1 21 ± 1 |
| 検量線用ソフト名 | GENESIS-Lite (Labsystems 社製) |
| 試験機関・担当者 | 名古屋市環境科学研究所 水質部 研究員 山守 英朋 |

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 | 未標識 PBDE-47 標準品 | AccuStandard | 分析用標準品 | 5µg | BDE-047S | B4090166 |
| 類似物質 | 未標識 PBDE-99 標準品 | AccuStandard | 分析用標準品 | 5µg | BDE-099S | B4010260 |
| | 未標識 PBDE-28 標準品 | AccuStandard | 分析用標準品 | 5µg | BDE-028S | B2090083 |
| | 未標識 PBDE-100 標準品 | AccuStandard | 分析用標準品 | 5µg | BDE-100S | B4010261 |

試験操作

実証試験計画書に従い実施した。

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 | ポリ臭化ジフェニルエーテル |
| 対象製品名 | ポリ臭化ジフェニルエーテル (PBDE) ELISA キット (マグネティック・パーティクル) |
| 製品番号 | ロット番号：5 J 1 7 5 6 |
| 製造年月日 | 平成17年10月 |
| 測定範囲 (製品仕様) | 0.025 ~ 1.0 µg/L |
| 試験日時 | 平成17年12月6日 14:00 ~ 17:00 |
| 試験場所 | 名古屋市環境科学研究所 防止技術実験室 |
| 試験時室内温度 | 22 ± 1 |
| 使用した市販標準品 | 物質名：PBDE-47 試薬会社名：AccuStandard INC. 製品番号：BDE-047S ロット番号：B2090083 |
| 使用した妨害物質名 | 物質名：フミン酸ナトリウム 試薬会社名：アクロス社 製品番号：120860050 ロット番号：A0207160001 |
| 検量線用ソフト名 | GENESIS-Lite (Labsystems 社製) |
| 試験機関・担当者 | 名古屋市環境科学研究所 水質部 研究員 山守 英朋 |

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 |
|------|-----------|-------------|---------|---------------------|
| S1 | 大森橋 (矢田川) | 平成17年11月25日 | 3L × 3本 | PH:7.6 COD: 17mgO/L |

試験操作

実証試験計画書に従い実施した。

(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 4.3.3 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 | ポリ臭化ビフェニルエーテル |
| 対象製品名 | ポリ臭化ジフェニルエーテル (PBDE) ELISA キット (マグネティック・パーティクル) |
| 製品番号 | ロット番号: 5 J 1 7 5 6 |
| 製造年月日 | 平成 17 年 1 0 月 |
| 測定範囲 (製品仕様) | 0.025 ~ 1.0 µg/L |
| 試験日時 | 平成 17 年 12 月 9 日 14:30 ~ 17:00 |
| 試験場所 | 名古屋市環境科学研究所 防止技術実験室 (ELISA 法) 名古屋市環境科学研究所 第一機器分析室 (機器分析) |
| 試験時室内温度 | 22 ± 2 |
| 検量線用ソフト名 | GENESIS-Lite (Labsystems 社製) |
| 試験機関・担当者 | 名古屋市環境科学研究所 水質部 研究員 山守 英朋 (ELISA) 水質部 主任研究員 渡辺 正敏 (機器分析) ダイオキシン分析研究センター 研究員 鈴木 直喜 (機器分析) |

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 |
|------|-----------|-------------------|----------|---|
| S1 | 大森橋 (矢田川) | 平成 17 年 11 月 25 日 | 3L × 3 本 | PH:7.6 COD:17mgO/L SS:10mg/L Cl ⁻ :31mg/L |
| S2 | 小塩橋 (堀川) | 同上 | 3L × 3 本 | PH:6.8 COD:7.7mgO/L SS:7.1mg/L Cl ⁻ :1900mg/L |
| S3 | 新瑞橋 (山崎川) | 同上 | 3L × 3 本 | PH:6.7 COD:2.4mgO/L SS:8.3mg/L Cl ⁻ :15mg/L |

試験操作

実証試験計画書に従い実施した。

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 検量線用標準溶液の測定データ

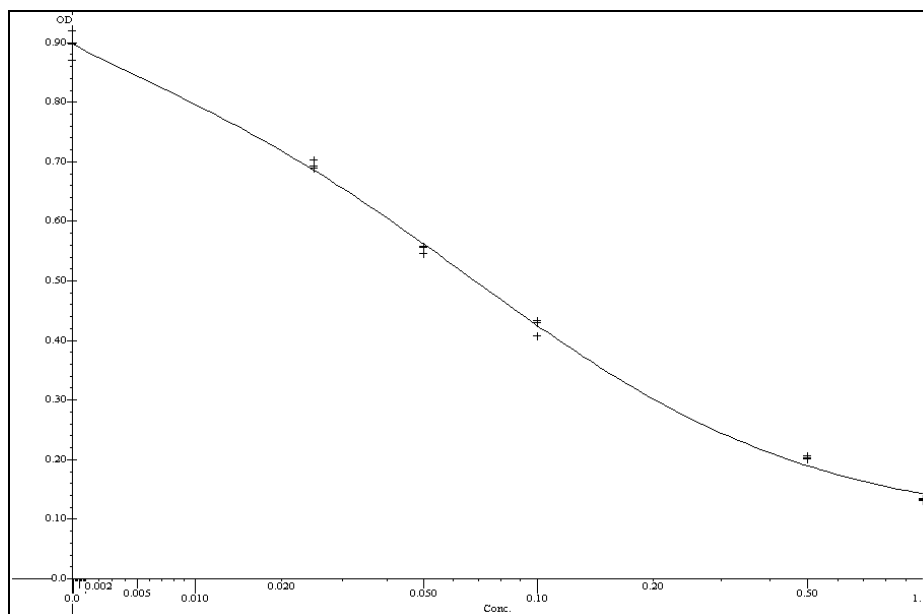
| 項目 | 単位 | 検量線用標準溶液 | | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | STD5 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.50 | 1.0 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | - | 0.871 | 0.703 | 0.547 | 0.431 | 0.203 | 0.131 |
| | 2 | - | 0.920 | 0.694 | 0.559 | 0.408 | 0.202 | 0.135 |
| | 3 | - | 0.898 | 0.689 | 0.556 | 0.433 | 0.206 | 0.133 |

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

| 回帰式の係数 | A | B | C | N | R ² |
|--------|-------|-------|------|-------|----------------|
| 値 | 0.897 | 0.087 | 13.7 | 0.991 | - * |

* ソフトウェアの仕様のため R² は計算されない

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 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 S0 | 溶液 S1 | 溶液 S2 | 溶液 S3 | 溶液 S4 | 溶液 S5 | | |
| 調製濃度 | μg/L | 0 | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.50 | 1.0 | | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | | |
| ELISA 実測 | 吸光度 | 1 | - | 0.891 | 0.705 | 0.567 | 0.405 | 0.188 | 0.130 |
| | | 2 | - | 0.904 | 0.683 | 0.534 | 0.411 | 0.189 | 0.134 |
| | | 3 | - | 0.896 | 0.674 | 0.569 | 0.415 | 0.191 | 0.133 |
| | | 平均 | - | 0.893 | 0.687 | 0.556 | 0.410 | 0.189 | 0.132 |
| | 換算値 | μg/L | - | 0.025 | 0.052 | 0.108 | 0.506 | 1.259 | |
| 標準偏差 | μg/L | - | 0.003 | 0.005 | 0.003 | 0.009 | 0.064 | | |
| 変動係数 | % | - | 10.2 | 10.3 | 2.6 | 1.7 | 5.1 | | |
| 相対値* | % | - | 100 | 104 | 108 | 101 | 126 | | |

* 調整濃度を 100%としたときの各実測濃度（3重測定の平均値）との割合（%）

評価

メーカーの指定する検量線用の 5 濃度系列に試験用試料溶液を調製し検討した。5 濃度系列とも、変動係数 20%以内となり良好な結果となった。したがって、測定濃度範囲は、メーカーの申請データどおり 0.025 ~ 1.0μg/L と判断される。ただし、検量線の高濃度側では、相対値が 126%とやや大きくなっており、留意する必要がある。

(2) 検出下限及び定量下限

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 5.1.4 検量線用標準溶液の測定データ

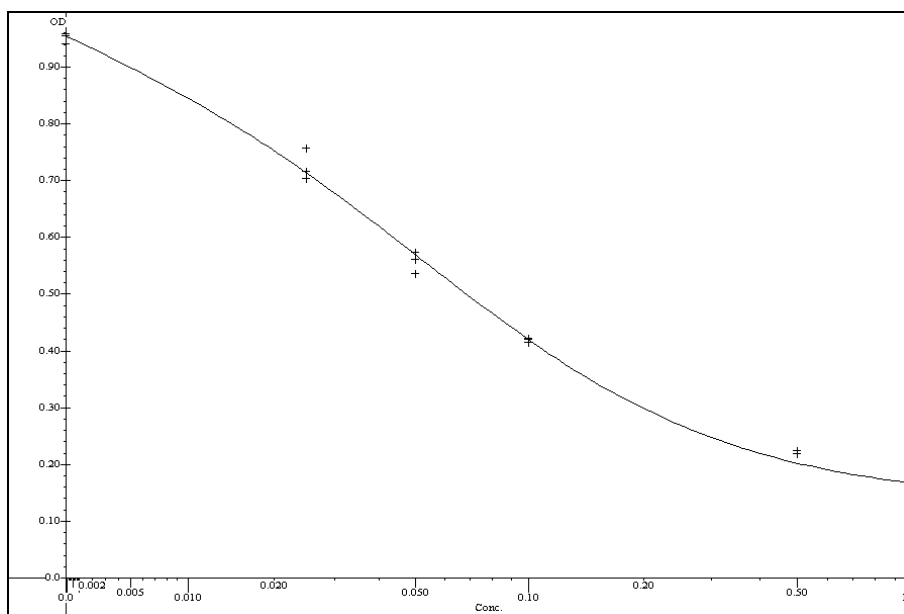
| 項目 | 単位 | 検量線用標準溶液 | | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | STD5 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.50 | 1.0 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | - | 0.941 | 0.716 | 0.573 | 0.422 | 0.225 | 0.152 |
| | 2 | - | 0.959 | 0.757 | 0.561 | 0.416 | 0.219 | 0.148 |
| | 3 | - | 0.955 | 0.704 | 0.536 | 0.421 | 0.225 | 0.152 |

表 5.1.5 採用した回帰式係数[$Y = B + (A - B)/(1 + C \cdot X^N)$ の場合]

| 回帰式の係数 | A | B | C | N | R ² |
|--------|-------|-------|------|------|----------------|
| 値 | 0.953 | 0.132 | 22.7 | 1.08 | - * |

* ソフトウェアの仕様のため R² は計算されない

図 5.1.2 検量線



試験結果記録（検出下限 1 および定量下限）

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 5.1.6 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 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | |
| 実測回数 | 回 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | - | 0.742 | 0.734 | 0.717 | 0.700 | 0.706 | 0.707 | 0.712 | 0.708 |
| | 2 | - | 0.728 | 0.706 | 0.706 | 0.712 | 0.716 | 0.719 | 0.707 | 0.719 |
| | 3 | - | 0.732 | 0.719 | 0.727 | 0.720 | 0.704 | 0.726 | 0.708 | 0.710 |
| | 平均 | - | 0.734 | 0.720 | 0.717 | 0.711 | 0.709 | 0.717 | 0.709 | 0.712 |
| 換算値 | μg/L | 0.022 | 0.024 | 0.025 | 0.025 | 0.026 | 0.025 | 0.026 | 0.025 | |
| 標準偏差 | μg/L | 0.0011 | | | | | | | | |

検出下限 1 (3SD) = 0.0033μg/L

定量下限 (10SD) = 0.011μg/L

試験結果記録（検出下限 2）

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 5.1.7 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 S0 | |
| 調製濃度 | μg/L | 0 | |
| 実測回数 | 回 | 10 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 / 2 | - | 0.956 0.941 |
| | 3 / 4 | - | 0.957 0.960 |
| | 5 / 6 | - | 0.976 0.927 |
| | 7 / 8 | - | 0.923 0.931 |
| | 9 / 10 | - | 0.936 0.950 |
| 平均値 | - | 0.9457 | |
| 標準偏差 | - | 0.0169 | |

計 算

S0 の平均 ABS-3S.D.= 0.9457-3×0.0169=0.8949

回帰式 (表 5.1.5) に当てはめ定量して 検出下限 2 : 0.0053μg/L

評 価

メーカーが申請する下限濃度 (0.025μg/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 1 (3SD) および定量下限 (10SD) は、それぞれ 0.0033μg/L および 0.011μg/L となった。また、濃度 0μg/L の吸光度から求めた検出下限 2 は 0.0053μg/L であった。この結果は、メーカー申請データ (検出下限 : 0.020μg/L、定量下限 : 0.025μg/L) とよく一致した。

(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 5.1.8 検量線用標準溶液の測定データ

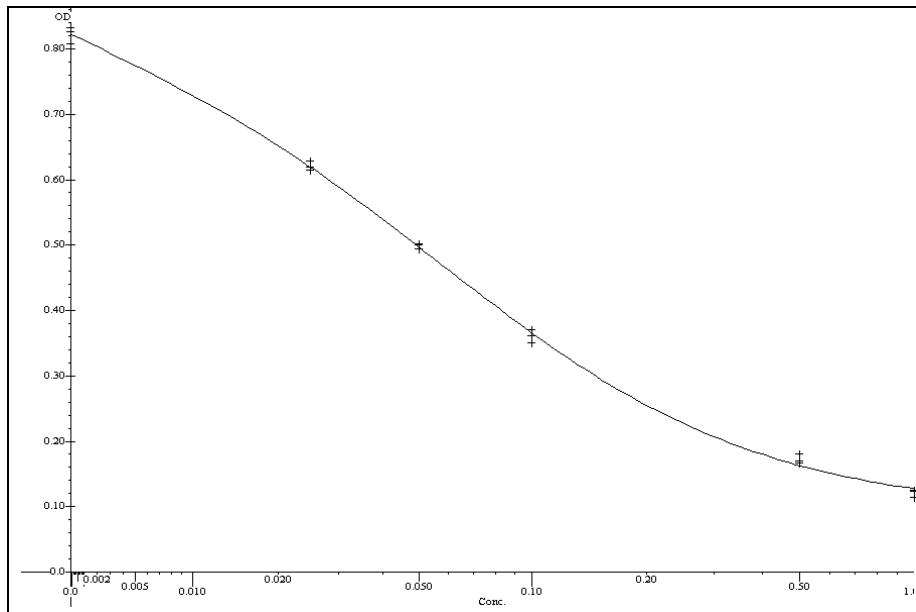
| 項目 | 単位 | 検量線用標準溶液 | | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | STD5 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.50 | 1.0 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | - | 0.832 | 0.614 | 0.500 | 0.361 | 0.181 | 0.125 |
| | 2 | - | 0.807 | 0.628 | 0.502 | 0.371 | 0.167 | 0.123 |
| | 3 | - | 0.826 | 0.620 | 0.494 | 0.351 | 0.170 | 0.114 |

表 5.1.9 採用した回帰式係数 [$Y = B + (A - B) / (1 + C \cdot X^N)$ の場合]

| 回帰式の係数 | A | B | C | N | R ² |
|--------|-------|-------|------|------|----------------|
| 値 | 0.822 | 0.090 | 18.8 | 1.05 | - * |

* ソフトウェアの仕様のため R² は計算されない

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 5.1.10 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 S3 | | | | | | | | |
| 調製濃度 | μg/L | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | |
| 実測回数 | 回 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | - | 0.344 | 0.364 | 0.362 | 0.361 | 0.358 | 0.368 | 0.352 | 0.364 |
| | 2 | - | 0.358 | 0.352 | 0.354 | 0.365 | 0.357 | 0.367 | 0.365 | 0.351 |
| | 3 | - | 0.374 | 0.352 | 0.367 | 0.358 | 0.359 | 0.362 | 0.354 | 0.370 |
| | 平均 | - | 0.359 | 0.356 | 0.361 | 0.361 | 0.358 | 0.366 | 0.357 | 0.362 |
| | 換算値 | μg/L | 0.104 | 0.106 | 0.103 | 0.102 | 0.104 | 0.100 | 0.105 | 0.102 |
| 標準偏差 | μg/L | 0.0017 | | | | | | | | |
| 変動係数 | % | 1.7 | | | | | | | | |

評価

検量線濃度系列の中間濃度に相当する濃度 0.10μg/L で、8 回繰返し試験を行った場合の変動係数は 1.7% となり、メーカー申請データ (0.2μg/L での変動係数 2.74%) とよく一致し、良好な結果であった。

(4) 日間再現性

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 5.1.11.1 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 | STD5 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.50 | 1.0 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | - | 0.817 | 0.641 | 0.479 | 0.366 | 0.168 | 0.125 |
| | 2 | - | 0.809 | 0.629 | 0.476 | 0.364 | 0.166 | 0.114 |
| | 3 | - | 0.789 | 0.627 | 0.488 | 0.354 | 0.164 | 0.120 |

表 5.1.12.1 採用した回帰式係数[$Y = B + (A - B)/(1 + C \cdot X^N)$ の場合]

| 回帰式の係数 | A | B | C | N | R ² |
|--------|-------|-------|------|------|----------------|
| 値 | 0.807 | 0.100 | 25.1 | 1.15 | - * |

* ソフトウェアの仕様のため R² は計算されない

図 5.1.4.1 検量線

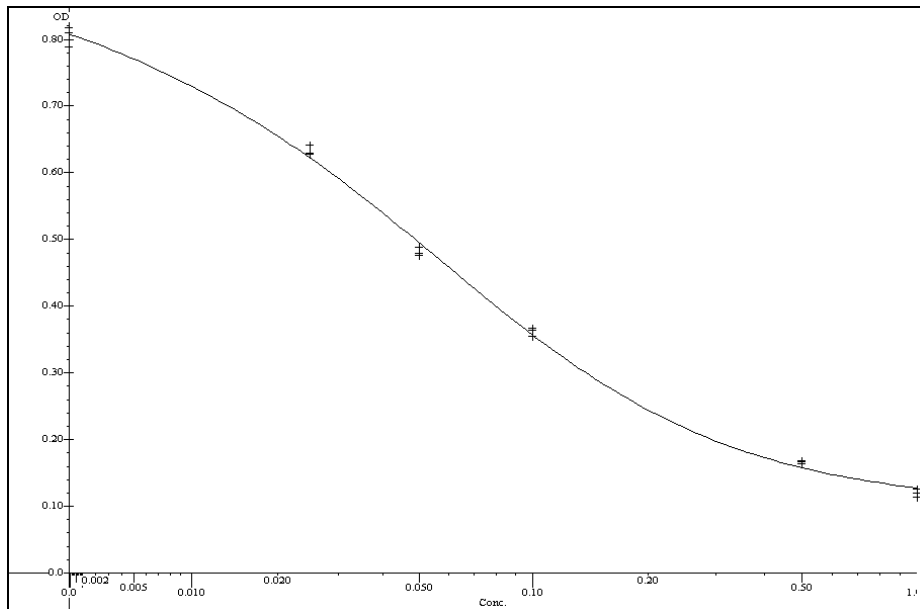


表 5.1.11.2 検量線用標準溶液の測定データ

| 項目 | 単位 | 検量線用標準溶液 | | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | STD5 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.50 | 1.0 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | - | 0.812 | 0.617 | 0.469 | 0.346 | 0.168 | 0.121 |
| | 2 | - | 0.809 | 0.614 | 0.488 | 0.344 | 0.168 | 0.123 |
| | 3 | - | 0.805 | 0.615 | 0.467 | 0.348 | 0.169 | 0.117 |

表 5.1.12.2 採用した回帰式係数[$Y = B + (A - B)/(1 + C \cdot X^N)$ の場合]

| 回帰式の係数 | A | B | C | N | R ² |
|--------|-------|-------|------|------|----------------|
| 値 | 0.809 | 0.102 | 26.0 | 1.13 | - * |

* ソフトウェアの仕様のため R² は計算されない

図 5.1.4.2 検量線

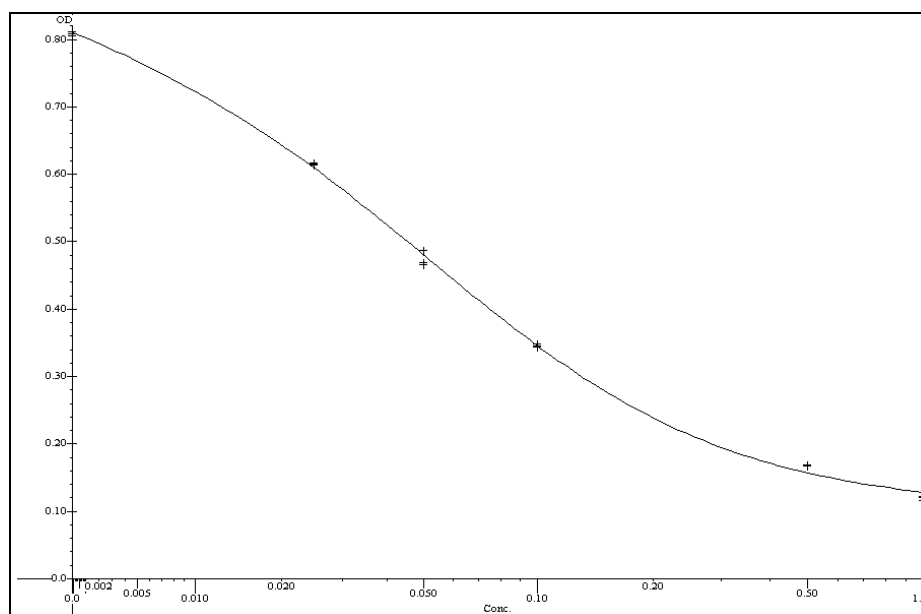


表 5.1.11.3 検量線用標準溶液の測定データ

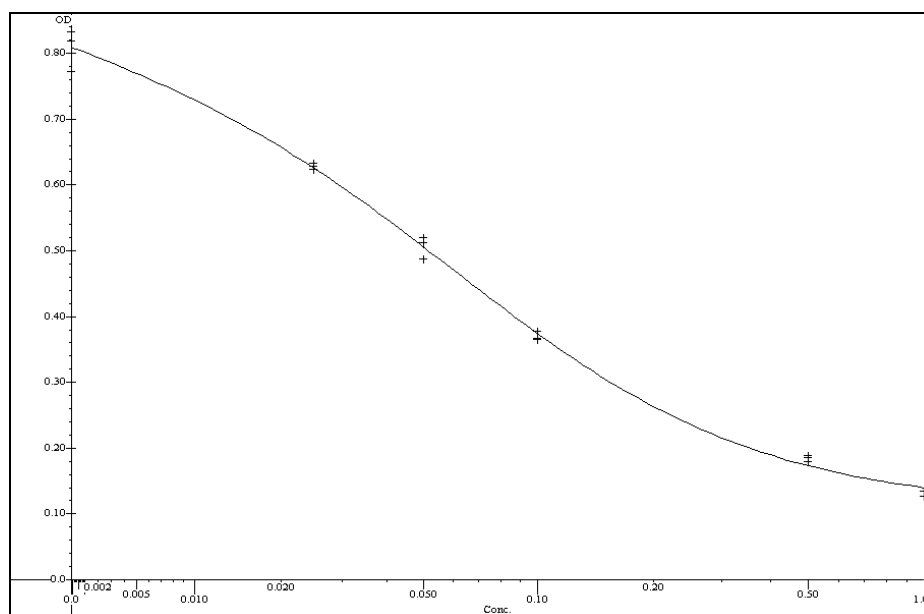
| 項目 | 単位 | 検量線用標準溶液 | | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | STD5 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.50 | 1.0 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | - | 0.818 | 0.628 | 0.488 | 0.366 | 0.188 | 0.135 |
| | 2 | - | 0.772 | 0.632 | 0.512 | 0.377 | 0.185 | 0.134 |
| | 3 | - | 0.833 | 0.624 | 0.519 | 0.365 | 0.179 | 0.126 |

表 5.1.12.3 採用した回帰式係数[$Y = B + (A - B)/(1 + C \cdot X^N)$ の場合]

| 回帰式の係数 | A | B | C | N | R ² |
|--------|-------|-------|------|------|----------------|
| 値 | 0.808 | 0.107 | 20.7 | 1.10 | - * |

* ソフトウェアの仕様のため R² 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 5.1.13 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 S0 | | | 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 | 1日 | 2日 | 3日 | | |
| 調製濃度 | μg/L | 0 | 0 | 0 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | | |
| ELISA実測 | 吸光度 | 1 | - | 0.812 | 0.810 | 0.818 | 0.606 | 0.629 | 0.618 | 0.499 | 0.495 | 0.506 | 0.346 | 0.336 | 0.364 | 0.160 | 0.169 | 0.181 | 0.116 | 0.120 | 0.138 |
| | | 2 | - | 0.827 | 0.800 | 0.810 | 0.640 | 0.610 | 0.612 | 0.485 | 0.505 | 0.502 | 0.349 | 0.334 | 0.366 | 0.174 | 0.167 | 0.178 | 0.117 | 0.131 | 0.139 |
| | | 3 | - | 0.809 | 0.788 | 0.812 | 0.618 | 0.624 | 0.614 | 0.484 | 0.499 | 0.507 | 0.337 | 0.349 | 0.359 | 0.171 | 0.173 | 0.168 | 0.117 | 0.130 | 0.134 |
| | 平均 | - | 0.816 | 0.794 | 0.813 | 0.622 | 0.621 | 0.615 | 0.490 | 0.500 | 0.505 | 0.344 | 0.339 | 0.363 | 0.169 | 0.169 | 0.176 | 0.117 | 0.127 | 0.137 | |
| 換算値 | μg/L | | | - | 0.025 | 0.023 | 0.027 | 0.051 | 0.045 | 0.050 | 0.107 | 0.104 | 0.106 | 0.429 | 0.414 | 0.482 | 1.554 | 1.121 | 1.090 | | |
| 標準偏差 | μg/L | | | - | | | 0.0017 | | | 0.0032 | | | 0.0018 | | | 0.037 | | | 0.25 | | |
| 変動係数 | % | | | - | | | 6.6 | | | 6.4 | | | 1.6 | | | 8.4 | | | 20.6 | | |

評価

同一週の3日間で測定した場合の変動係数は、メーカーの申請値(0.10μg/Lにおける変動係数 2.2%)とよく一致し 1.6%であった。また、0.5μg/L以下の4濃度系列でも、変動係数10%以内で良好な結果であった。しかし、1.0μg/Lの濃度系列においては、変動係数20.6%とばらつきがやや大きかった。原因として、この測定濃度は、検量線の直線領域からはずれ、傾きの非常に小さいところで定量しているため、わずかな吸光度変化で定量値が大きく変化することが考えられた。

(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 5.1.14.1 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 | STD5 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.50 | 1.0 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | - | 0.871 | 0.703 | 0.547 | 0.431 | 0.203 | 0.131 |
| | 2 | - | 0.920 | 0.694 | 0.559 | 0.408 | 0.202 | 0.135 |
| | 3 | - | 0.898 | 0.689 | 0.556 | 0.433 | 0.206 | 0.133 |

表 5.1.15.1 採用した回帰式係数[$Y = B + (A - B)/(1 + C \cdot X^N)$ の場合]

| 回帰式の係数 | A | B | C | N | R ² |
|--------|-------|-------|------|-------|----------------|
| 値 | 0.897 | 0.087 | 13.7 | 0.991 | - * |

* ソフトウェアの仕様のため R² は計算されない

図 5.1.5.1 検量線

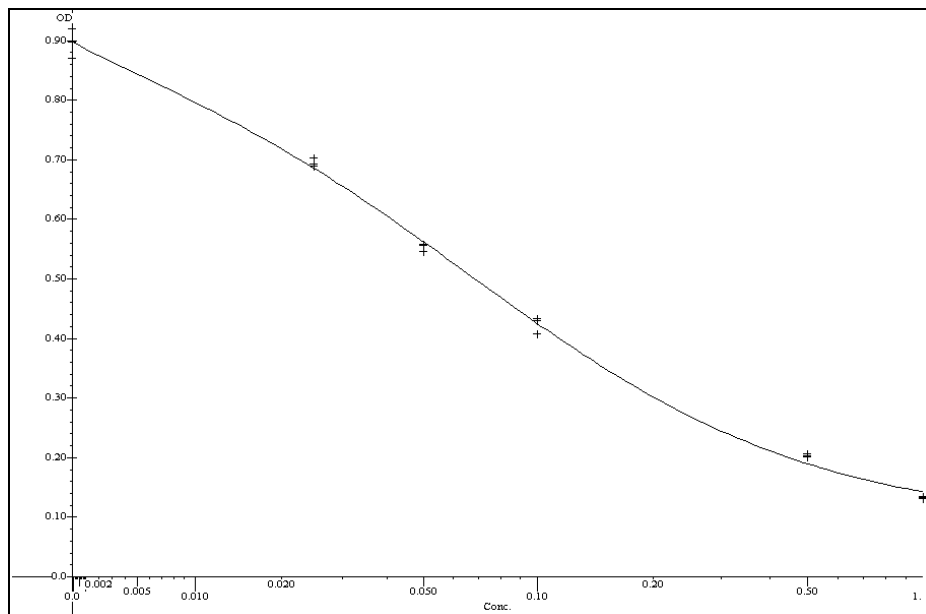


表 5.1.14.2 検量線用標準溶液の測定データ

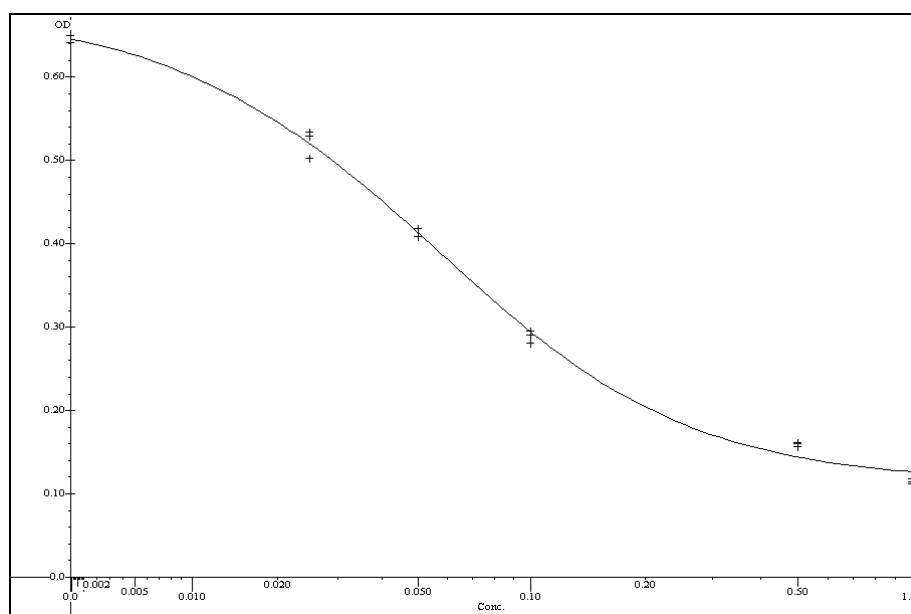
| 項目 | 単位 | 検量線用標準溶液 | | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | STD5 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.50 | 1.0 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | - | 0.650 | 0.529 | 0.418 | 0.281 | 0.157 | 0.118 |
| | 2 | - | 0.641 | 0.503 | 0.409 | 0.296 | 0.161 | 0.112 |
| | 3 | - | 0.641 | 0.534 | 0.418 | 0.291 | 0.160 | 0.114 |

表 5.1.15.2 採用した回帰式係数[$Y = B + (A - B)/(1 + C \cdot X^N)$ の場合]

| 回帰式の係数 | A | B | C | N | R ² |
|--------|-------|-------|------|------|----------------|
| 値 | 0.644 | 0.114 | 41.5 | 1.33 | - * |

* ソフトウェアの仕様のため R² 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 5.1.16 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 S0 | | 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 | 0 | 1ヶ月 | | |
| 調製濃度 | μg/L | 0 | 0 | 0.025 | 0.025 | 0.05 | 0.05 | 0.10 | 0.10 | 0.50 | 0.50 | 1.0 | 1.0 | | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | | |
| ELISA実測 | 吸光度 | 1 | - | 0.891 | 0.689 | 0.705 | 0.519 | 0.567 | 0.413 | 0.405 | 0.292 | 0.188 | 0.156 | 0.130 | 0.122 |
| | | 2 | - | 0.904 | 0.665 | 0.683 | 0.538 | 0.534 | 0.414 | 0.411 | 0.292 | 0.189 | 0.147 | 0.134 | 0.119 |
| | | 3 | - | 0.896 | 0.698 | 0.674 | 0.530 | 0.569 | 0.406 | 0.415 | 0.295 | 0.191 | 0.148 | 0.133 | 0.123 |
| | | 平均 | - | 0.896 | 0.684 | 0.687 | 0.529 | 0.556 | 0.411 | 0.410 | 0.293 | 0.189 | 0.150 | 0.132 | 0.121 |
| | 換算値 | μg/L | - | - | 0.025 | 0.023 | 0.052 | 0.051 | 0.108 | 0.101 | 0.506 | 0.433 | 1.26 | 1.51 | |
| 標準偏差 | μg/L | - | - | 0.003 | 0.002 | 0.005 | 0.001 | 0.003 | 0.001 | 0.009 | 0.045 | 0.064 | 0.408 | | |
| 変動係数 | % | - | - | 10.2 | 7.9 | 10.3 | 2.5 | 2.6 | 1.0 | 1.7 | 10.4 | 5.1 | 26.8 | | |

評価

1ヶ月を隔てて測定した場合の変動係数は、メーカーの申請値(0.10μg/Lにおける変動係数4.74%)とよく一致し1.0%であった。また、0.5μg/L以下の4濃度系列でも、変動係数10%以内で良好な結果であった。しかし、1.0μg/Lの濃度系列においては、変動係数26.8%とばらつきがやや大きかった。また、相対値も151%と大きくなった。これも、日間再現性と同様に、検量線の傾きが非常に小さいところで定量していることに起因しており、さらに、本データでは、吸光度の値も他のデータより小さかったため、傾向がより顕著に表れたと考えられる。

(6) キット間再現性

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 5.1.17.1 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 | STD5 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.50 | 1.0 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | - | 0.739 | 0.618 | 0.465 | 0.380 | 0.184 | 0.122 |
| | 2 | - | 0.723 | 0.600 | 0.457 | 0.345 | 0.185 | 0.119 |
| | 3 | - | 0.737 | 0.611 | 0.468 | 0.334 | 0.181 | 0.109 |

表 5.1.18.1 採用した回帰式係数[$Y = B + (A - B)/(1 + C \cdot X^N)$ の場合]

| 回帰式の係数 | A | B | C | N | R ² |
|--------|-------|-------|------|------|----------------|
| 値 | 0.736 | 0.111 | 26.3 | 1.21 | - * |

* ソフトウェアの仕様のため R² は計算されない

図 5.1.6.1 検量線

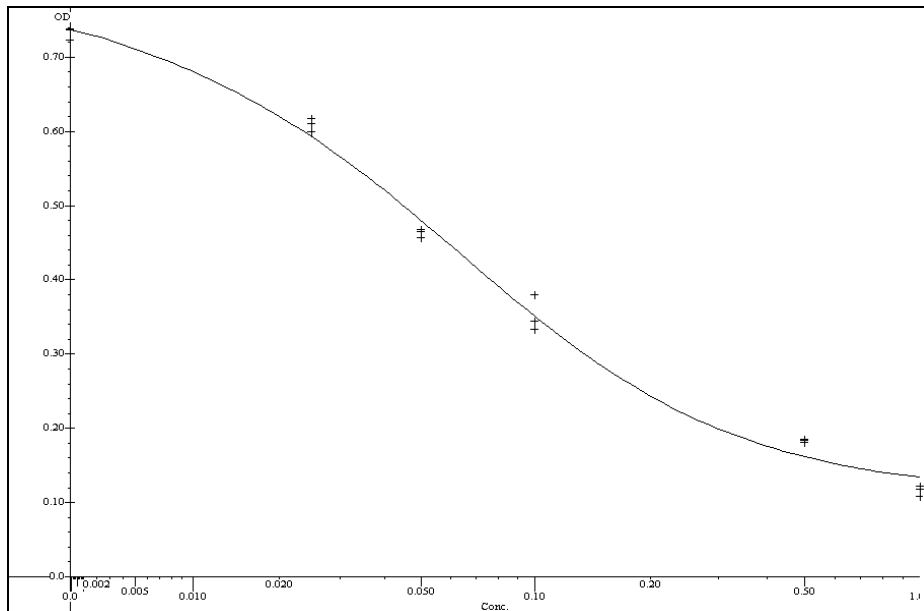


表 5.1.17.2 検量線用標準溶液の測定データ(プレート B)

| 項目 | 単位 | 検量線用標準溶液 | | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | STD5 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.50 | 1.0 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | - | 0.871 | 0.703 | 0.547 | 0.431 | 0.203 | 0.131 |
| | 2 | - | 0.920 | 0.694 | 0.559 | 0.408 | 0.202 | 0.135 |
| | 3 | - | 0.898 | 0.689 | 0.556 | 0.433 | 0.206 | 0.133 |

表 5.1.18.2 採用した回帰式係数[$Y = B + (A - B)/(1 + C \cdot X^N)$ の場合]

| 回帰式の係数 | A | B | C | N | R ² |
|--------|-------|-------|------|-------|----------------|
| 値 | 0.897 | 0.087 | 13.7 | 0.991 | - * |

* ソフトウェアの仕様のため R² は計算されない

図 5.1.6.2 検量線

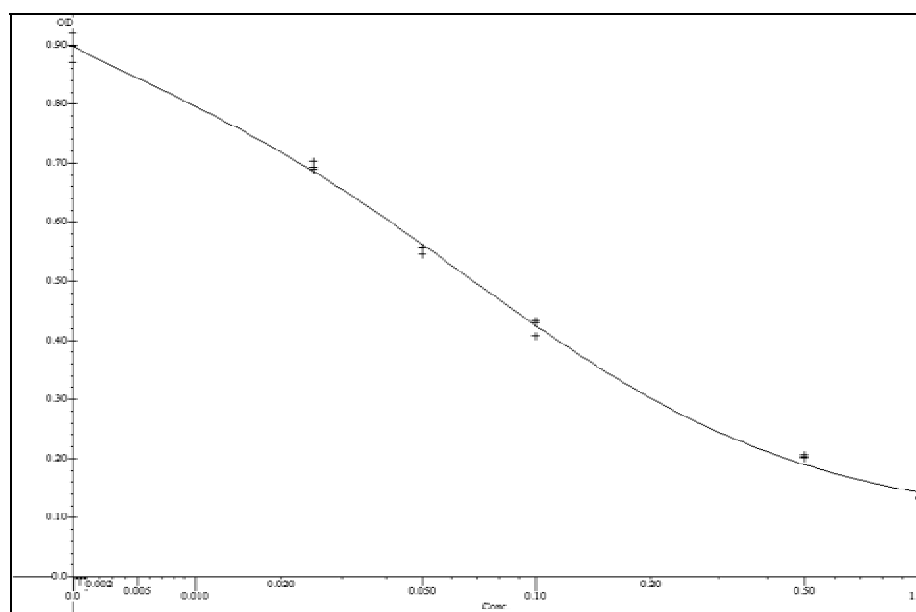


表 5.1.17.3 検量線用標準溶液の測定データ(プレート C)

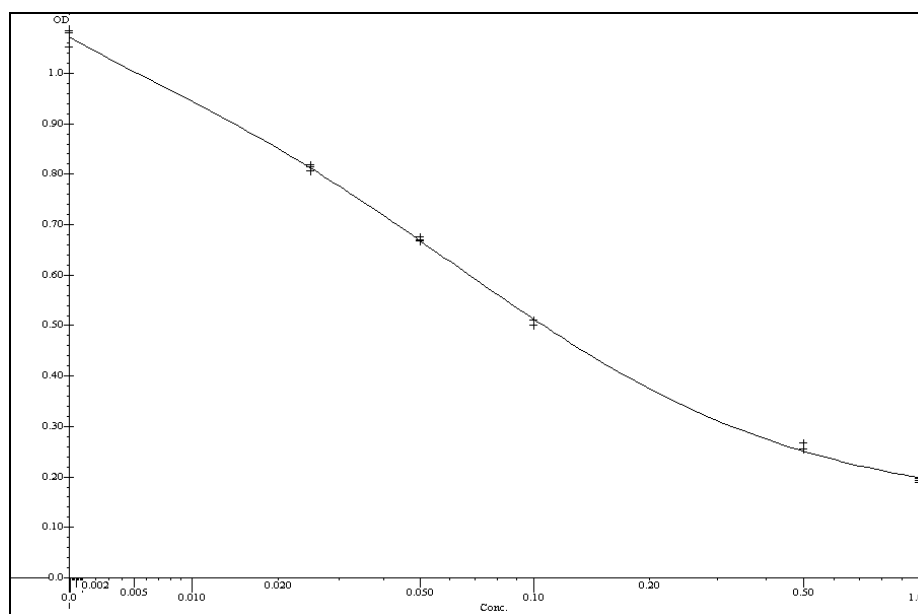
| 項目 | 単位 | 検量線用標準溶液 | | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | STD5 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.50 | 1.0 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | - | 1.084 | 0.818 | 0.670 | 0.511 | 0.267 | 0.193 |
| | 2 | - | 1.052 | 0.806 | 0.667 | 0.500 | 0.255 | 0.190 |
| | 3 | - | 1.081 | 0.814 | 0.676 | 0.511 | 0.256 | 0.197 |

表 5.1.18.3 採用した回帰式係数[$Y = B + (A - B)/(1 + C \cdot X^N)$ の場合]

| 回帰式の係数 | A | B | C | N | R ² |
|--------|------|-------|------|-------|----------------|
| 値 | 1.07 | 0.136 | 14.0 | 0.974 | - * |

* ソフトウェアの仕様のため R² 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 5.1.19 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 S0 | | | 溶液 S1 | | | 溶液 S2 | | | 溶液 S3 | | | 溶液 S4 | | | 溶液 S5 | | | | |
| | | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | | |
| 調製濃度 | μg/L | 0 | 0 | 0 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | | |
| ELISA実測 | 吸光度 | 1 | - | 0.779 | 0.891 | 1.068 | 0.583 | 0.705 | 0.829 | 0.499 | 0.567 | 0.676 | 0.348 | 0.405 | 0.493 | 0.172 | 0.188 | 0.269 | 0.132 | 0.130 | 0.187 |
| | | 2 | - | 0.790 | 0.904 | 1.087 | 0.605 | 0.683 | 0.825 | 0.493 | 0.534 | 0.685 | 0.349 | 0.411 | 0.513 | 0.178 | 0.189 | 0.252 | 0.128 | 0.134 | 0.187 |
| | | 3 | - | 0.785 | 0.896 | 1.078 | 0.592 | 0.674 | 0.816 | 0.499 | 0.569 | 0.690 | 0.334 | 0.415 | 0.496 | 0.182 | 0.191 | 0.263 | 0.130 | 0.133 | 0.187 |
| | | 平均 | - | 0.785 | 0.897 | 1.078 | 0.593 | 0.687 | 0.823 | 0.497 | 0.556 | 0.684 | 0.343 | 0.410 | 0.501 | 0.177 | 0.189 | 0.261 | 0.130 | 0.132 | 0.187 |
| 換算値 | μg/L | | | - | 0.025 | 0.025 | 0.023 | 0.046 | 0.052 | 0.047 | 0.104 | 0.108 | 0.106 | 0.395 | 0.506 | 0.454 | 1.205 | 1.261 | 1.258 | | |
| 標準偏差 | μg/L | | | - | 0.0009 | | | 0.0034 | | | 0.0018 | | | 0.055 | | | 0.031 | | | | |
| 変動係数 | % | | | - | 3.9 | | | 7.2 | | | 1.7 | | | 12.2 | | | 2.5 | | | | |

評価

同一ロットの2キットおよび異なるロットの1キットを用いて測定した場合、5つの調製濃度系列とも変動係数は、12%以内で良好な結果となった。しかし、1.0μg/Lの濃度系列では、いずれのキットも、相対値が120、126、125%とやや大きく留意する必要はあった。

(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 5.1.20.1 検量線用標準溶液の測定データ

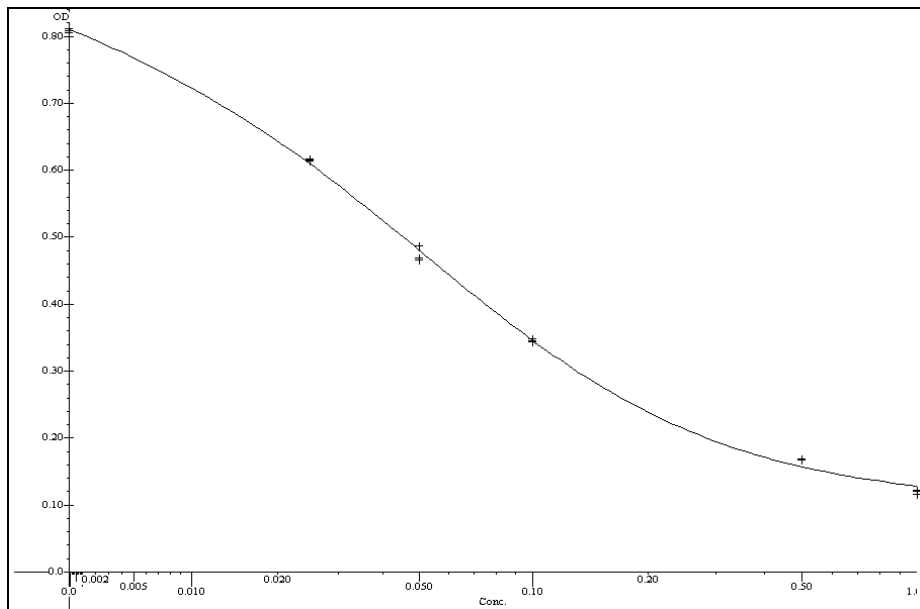
| 項目 | 単位 | 検量線用標準溶液 | | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | STD5 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.50 | 1.0 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | - | 0.812 | 0.617 | 0.469 | 0.346 | 0.168 | 0.121 |
| | 2 | - | 0.809 | 0.614 | 0.488 | 0.344 | 0.168 | 0.123 |
| | 3 | - | 0.805 | 0.615 | 0.467 | 0.348 | 0.169 | 0.117 |

表 5.1.21.1 採用した回帰式係数[$Y = B + (A - B)/(1 + C \cdot X^N)$ の場合]

| 回帰式の係数 | A | B | C | N | R ² |
|--------|-------|-------|------|------|----------------|
| 値 | 0.809 | 0.102 | 26.0 | 1.13 | - * |

* ソフトウェアの仕様のため R² 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。

P B D E - 4 7

表 5.1.20.2 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 S0 | 溶液 S1 | 溶液 S2 | 溶液 S3 | 溶液 S4 | 溶液 S5 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.50 | 1.0 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | - | 0.810 | 0.629 | 0.495 | 0.336 | 0.169 | 0.120 |
| | 2 | - | 0.800 | 0.610 | 0.505 | 0.334 | 0.167 | 0.131 |
| | 3 | - | 0.788 | 0.624 | 0.499 | 0.349 | 0.173 | 0.130 |

表 5.1.21.2 採用した回帰式係数[$Y = B + (A - B)/(1 + C \cdot X^N)$ の場合]

| 回帰式の係数 | A | B | C | N | R ² |
|--------|------|------|------|------|----------------|
| 値 | 99.9 | 14.3 | 34.3 | 1.24 | - * |

* ソフトウェアの仕様のため R² は計算されない

図 5.1.7.2 PBDE-47 の回帰曲線(%B/Bo)

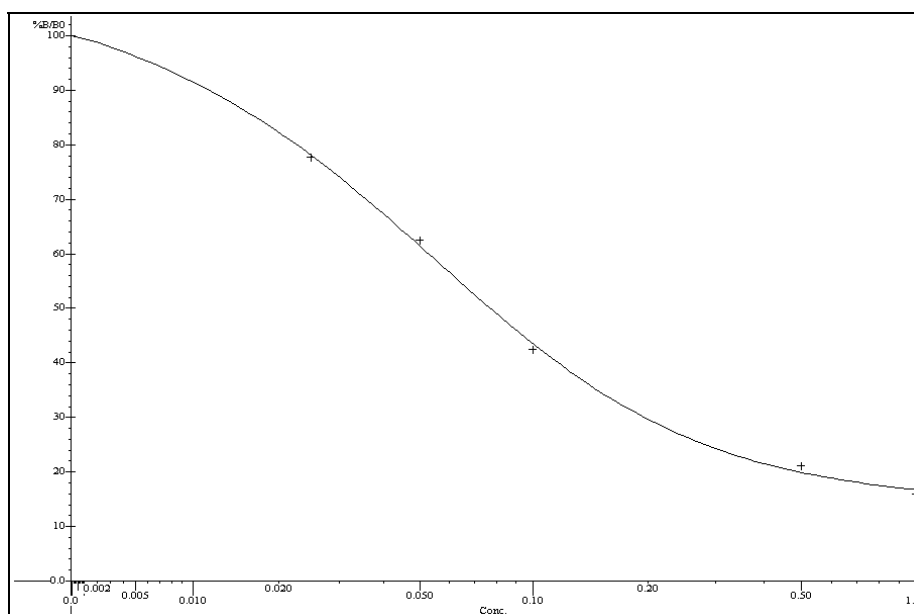


表 5.1.20.3 交差反応性物質の測定データ

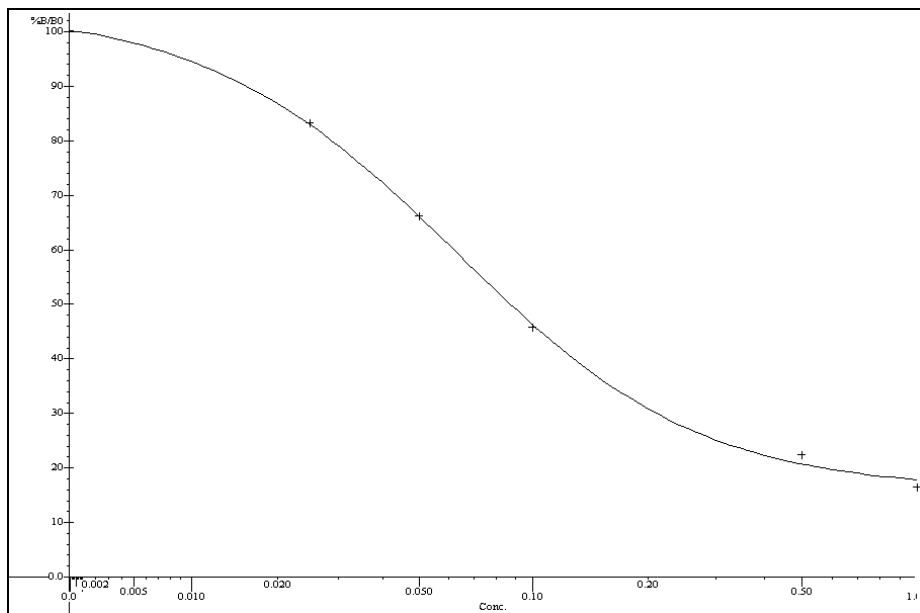
| 項目 | 単位 | 試験用試料溶液 | | | | | | |
|----------------------|------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 溶液 S0 | 溶液 S1 | 溶液 S2 | 溶液 S3 | 溶液 S4 | 溶液 S5 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.50 | 1.0 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | - | 0.810 | 0.666 | 0.526 | 0.368 | 0.183 | 0.131 |
| | 2 | - | 0.800 | 0.661 | 0.534 | 0.363 | 0.174 | 0.134 |
| | 3 | - | 0.788 | 0.670 | 0.527 | 0.368 | 0.180 | 0.131 |

表 5.1.21.3 採用した回帰式係数[$Y = B + (A - B) / (1 + C \cdot X^N)$ の場合]

| 回帰式の係数 | A | B | C | N | R ² |
|--------|-----|------|------|------|----------------|
| 値 | 100 | 15.9 | 43.9 | 1.39 | - * |

* ソフトウェアの仕様のため R² は計算されない

図 5.1.7.3 PBDE-99 の回帰曲線 (%B/Bo)



P B D E - 2 8

表 5.1.20.4 交差反応性物質の測定データ

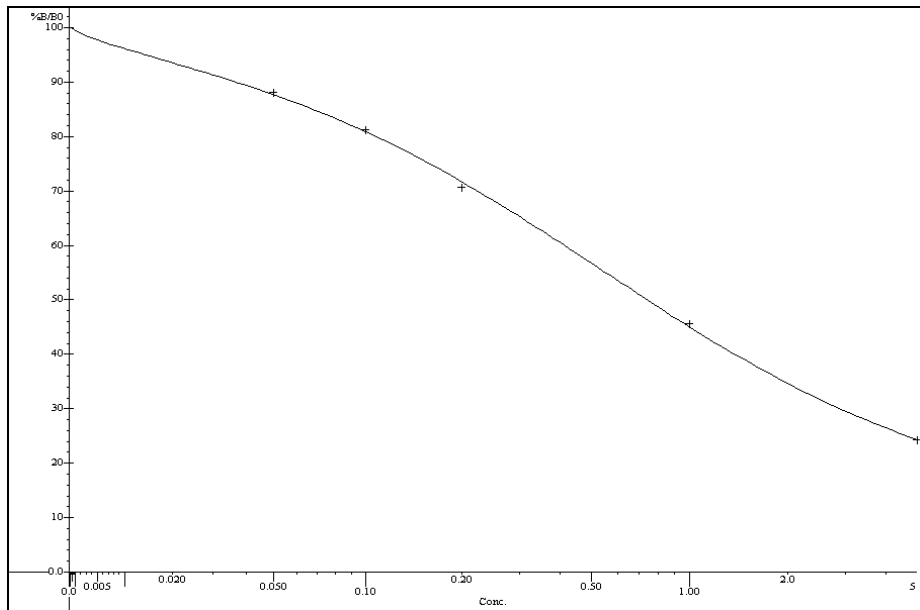
| 項目 | 単位 | 試験用試料溶液 | | | | | | |
|----------------------|------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 溶液 S0 | 溶液 S1 | 溶液 S2 | 溶液 S3 | 溶液 S4 | 溶液 S5 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 0.05 | 0.10 | 0.20 | 1.00 | 5.00 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | - | 0.810 | 0.712 | 0.649 | 0.553 | 0.369 | 0.197 |
| | 2 | - | 0.800 | 0.709 | 0.652 | 0.572 | 0.357 | 0.192 |
| | 3 | - | 0.788 | 0.694 | 0.649 | 0.570 | 0.367 | 0.192 |

表 5.1.21.4 採用した回帰式係数[$Y = B + (A - B)/(1 + C \cdot X^N)$ の場合]

| 回帰式の係数 | A | B | C | N | R ² |
|--------|-----|------|------|-------|----------------|
| 値 | 100 | 10.4 | 1.59 | 0.764 | - * |

* ソフトウェアの仕様のため R² は計算されない

図 5.1.7.4 PBDE-28 の回帰曲線(%B/Bo)



P B D E - 1 0 0

表 5.1.20.5 交差反応性物質の測定データ

| 項目 | 単位 | 試験用試料溶液 | | | | | | |
|----------------------|------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 溶液 S0 | 溶液 S1 | 溶液 S2 | 溶液 S3 | 溶液 S4 | 溶液 S5 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 0.10 | 0.50 | 5.0 | 10.0 | 50.0 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | - | 0.810 | 0.667 | 0.534 | 0.314 | 0.240 | 0.103 |
| | 2 | - | 0.800 | 0.658 | 0.520 | 0.316 | 0.244 | 0.110 |
| | 3 | - | 0.788 | 0.659 | 0.515 | 0.303 | 0.236 | 0.105 |

表 5.1.21.5 採用した回帰式係数[$Y = B + (A - B)/(1 + C \cdot X^N)$ の場合]

| 回帰式の係数 | A | B | C | N | R ² |
|--------|-----|-------|-------|-------|----------------|
| 値 | 100 | -8.50 | 0.615 | 0.474 | - * |

* ソフトウェアの仕様のため R² は計算されない

図 5.1.7.5 PBDE-100 の回帰曲線(%B/Bo)

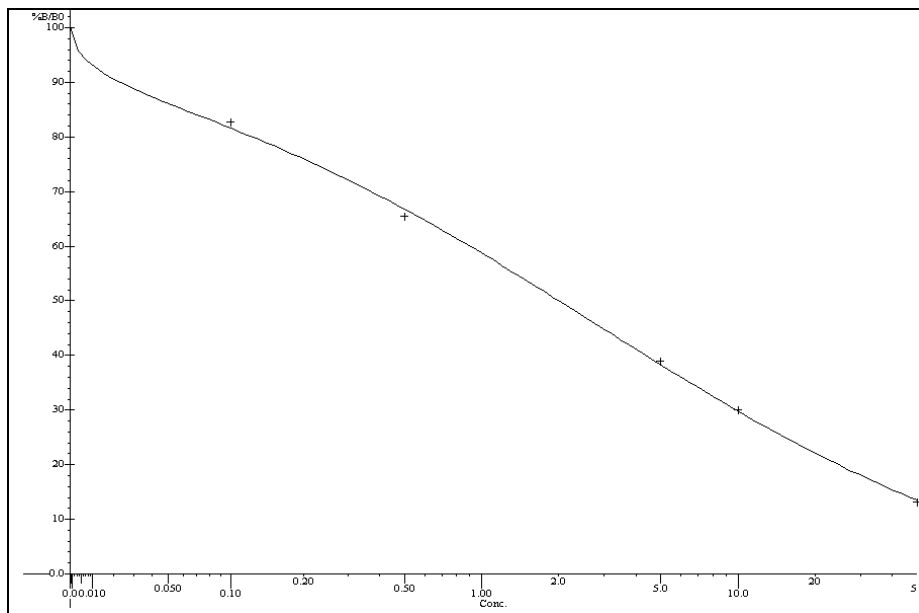


表 5.1.22 交差率

| | PBDE-47 | PBDE-99 | PBDE-28 | PBDE-100 |
|----------------|---------|---------|---------|----------|
| 50%阻害濃度 (μg/L) | 0.077 | 0.0874 | 0.743 | 2.01 |
| 交差率 (%) | 100.0 | 88.1 | 10.3 | 3.83 |

評 価

3 類似物質の交差反応率は、PBDE-99 : 88.1%、PBDE-28 : 10.3%、PBDE-100 : 3.83% となり、メーカー申請データ(PBDE-99 : 90.0%、PBDE-28 : 15.0%、PBDE-100 : 2.45%) とよく一致した。

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 検量線用標準溶液の測定データ

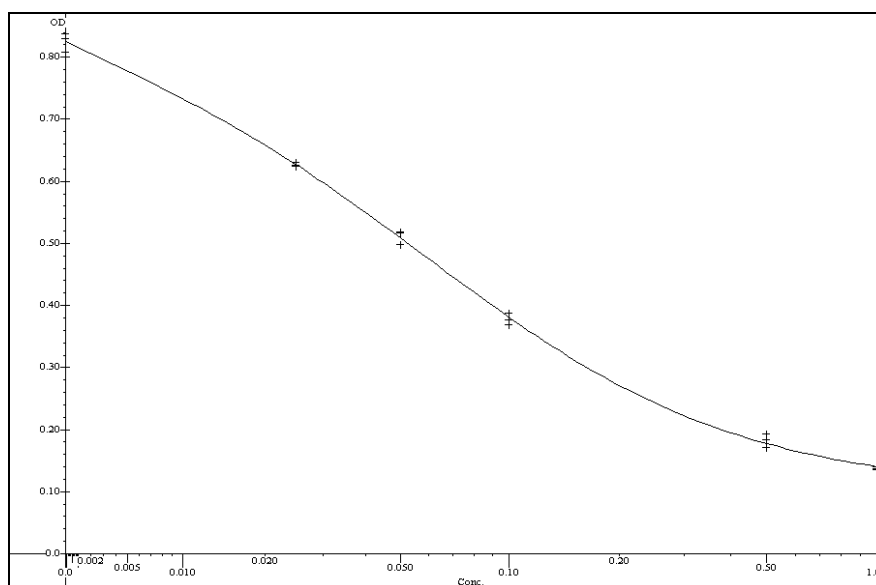
| 項目 | 単位 | 検量線用標準溶液 | | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | STD5 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.50 | 1.0 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | - | 0.838 | 0.624 | 0.499 | 0.387 | 0.184 | 0.137 |
| | 2 | - | 0.808 | 0.626 | 0.518 | 0.377 | 0.171 | 0.135 |
| | 3 | - | 0.830 | 0.631 | 0.517 | 0.369 | 0.193 | 0.140 |

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

| 回帰式の係数 | A | B | C | N | R ² |
|--------|-------|-------|------|------|----------------|
| 値 | 0.825 | 0.101 | 17.3 | 1.03 | - * |

* ソフトウェアの仕様のため R² 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：0.10 μ g/L）の PBDE-47 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 | | | | | | |
|-------------|------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 溶液 H0 | 溶液 H1 | 溶液 H2 | 溶液 H3 | 溶液 H4 | | |
| 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 | - | 0.382 | 0.363 | 0.360 | 0.382 | 0.367 |
| | | 2 | - | 0.361 | 0.363 | 0.357 | 0.368 | 0.364 |
| | | 3 | - | 0.373 | 0.356 | 0.359 | 0.366 | 0.363 |
| | | 平均 | - | 0.372 | 0.361 | 0.359 | 0.372 | 0.365 |
| | 換算値 | μ g/L | 0.105 | 0.112 | 0.114 | 0.105 | 0.110 | |
| 変動係数 | % | 6.03 | 2.31 | 0.88 | 4.87 | 1.19 | | |
| 回収率 | % | 105 | 112 | 114 | 105 | 110 | | |

評価

対象物質である PBDE-47 を測定濃度 0.10 μ g/L となるように河川ろ過水(PBDE-47 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による顕著な妨害は認められなかった。これは、メーカーの取扱説明書の記述（フミン酸 100mg/L までは妨害影響なし）とよく一致した。

(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 5.2.4.1 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 | STD5 | |
| 所定濃度 | μ g/L | 0 | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.50 | 1.0 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | - | 0.782 | 0.594 | 0.467 | 0.359 | 0.168 | 0.132 |
| | 2 | - | 0.770 | 0.591 | 0.457 | 0.360 | 0.167 | 0.128 |
| | 3 | - | 0.774 | 0.583 | 0.470 | 0.342 | 0.167 | 0.122 |

表 5.2.5.1 採用した回帰式係数[$Y = B + (A - B)/(1 + C \cdot X^N)$ の場合]

| 回帰式の係数 | A | B | C | N | R ² |
|--------|-------|-------|------|------|----------------|
| 値 | 0.775 | 0.094 | 18.2 | 1.04 | - * |

* ソフトウェアの仕様のため R² は計算されない

図 5.2.2.1 検量線

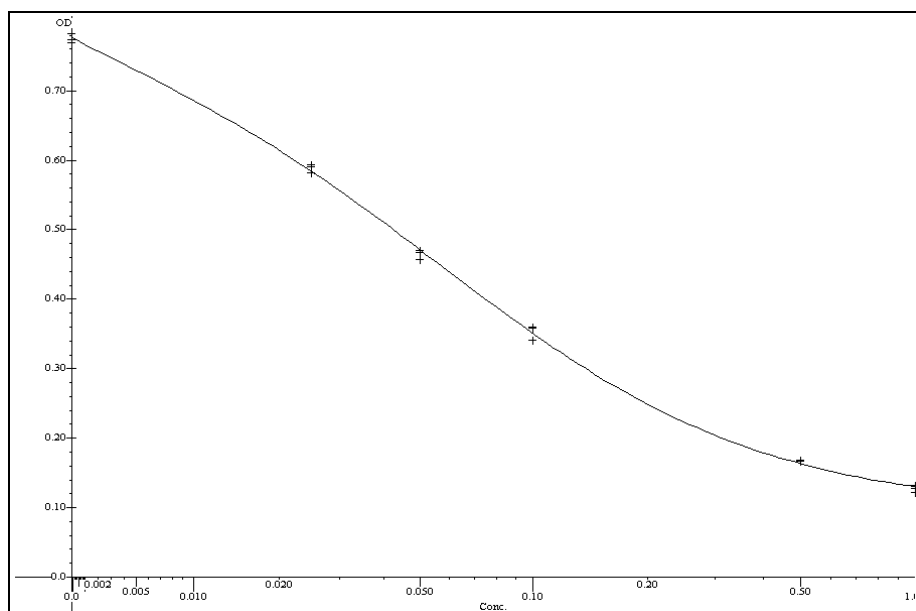


表 5.2.4.2 検量線用標準溶液の測定データ

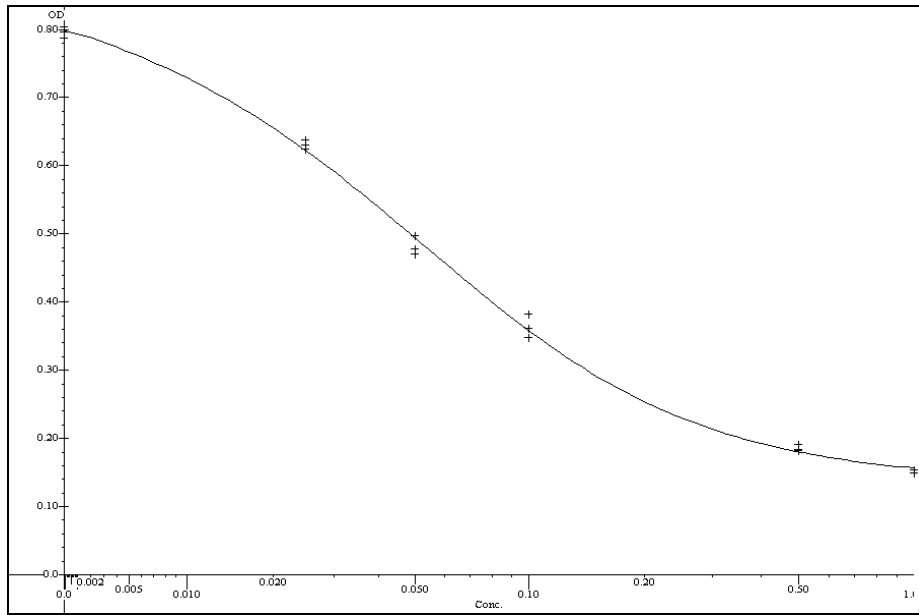
| 項目 | 単位 | 検量線用標準溶液 | | | | | | |
|----------------------|------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | ブランク | STD1 | STD2 | STD3 | STD4 | STD5 | |
| 所定濃度 | μg/L | 0 | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.50 | 1.0 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 (吸光度) | 1 | - | 0.804 | 0.625 | 0.478 | 0.348 | 0.191 | 0.150 |
| | 2 | - | 0.788 | 0.631 | 0.471 | 0.382 | 0.184 | 0.149 |
| | 3 | - | 0.797 | 0.638 | 0.497 | 0.361 | 0.183 | 0.154 |

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

| 回帰式の係数 | A | B | C | N | R ² |
|--------|-------|-------|------|------|----------------|
| 値 | 0.797 | 0.137 | 34.1 | 1.23 | - * |

* ソフトウェアの仕様のため R² は計算されない

図 5.2.2.2 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 5.2.6.1 環境試料定量結果(ELISA 法)

| 項目 | | 単位 | 試験用試料溶液 | | | |
|-------------|------|------|---------|---------|---------|---------|
| | | | 大森橋 | 小塩橋 | 新瑞橋 | |
| 実測回数 | | 回 | 3 | 3 | 3 | |
| ELISA 実測 | 吸光度 | 1 | - | 0.748 | 0.737 | 0.808 |
| | | 2 | - | 0.741 | 0.753 | 0.793 |
| | | 3 | - | 0.779 | 0.722 | 0.789 |
| 換算値 | μg/L | 1 | - | <0.0033 | <0.0033 | <0.0033 |
| | | 2 | - | <0.0033 | <0.0033 | <0.0033 |
| | | 3 | - | <0.0033 | <0.0033 | <0.0033 |
| 原水平均値 | | μg/L | <0.0033 | <0.0033 | <0.0033 | |
| 変動係数 | | % | - | - | - | |

ELISA 法の検出下限 1 は 0.0033μg/L、検出下限 2 は 0.0053μg/L であった。

表 5.2.6.2 環境試料定量結果(GC/MS 法)

| 項目 | 単位 | 試験用試料溶液 | | | |
|-------------|------|---------|---------|---------|---------|
| | | 大森橋 | 小塩橋 | 新瑞橋 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | |
| 定量値 μg/L | 1 | - | <0.0005 | <0.0005 | <0.0005 |
| | 2 | - | <0.0005 | <0.0005 | <0.0005 |
| | 3 | - | <0.0005 | <0.0005 | <0.0005 |
| 原水平均値 | μg/L | <0.0005 | <0.0005 | <0.0005 | |
| 変動係数 | % | - | - | - | |

GC/MS 法の検出下限値(MDL)は 0.0005μg/L(1000 倍濃縮時)であった。

表 5.2.6.3 添加回収試験結果(ELISA 法)

| 項目 | 単位 | 試験用試料溶液 | | | | | |
|--------------------|------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 精製水 | 大森橋 | 小塩橋 | 新瑞橋 | | |
| 調整濃度(原水) | μg/L | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | 3 | | |
| ELISA 実測 | 吸光度 | 1 | - | 0.669 | 0.637 | 0.638 | 0.674 |
| | | 2 | - | 0.661 | 0.661 | 0.645 | 0.687 |
| | | 3 | - | 0.664 | 0.659 | 0.644 | 0.663 |
| 定量値 μg/L | 1 | - | 0.018 | 0.023 | 0.023 | 0.017 | |
| | 2 | - | 0.019 | 0.019 | 0.022 | 0.016 | |
| | 3 | - | 0.019 | 0.020 | 0.022 | 0.019 | |
| 平均値 | μg/L | 0.019 | 0.020 | 0.022 | 0.017 | | |
| 変動係数 | % | 3.07 | 9.60 | 2.58 | 9.71 | | |
| 原水換算値* | μg/L | 0.037 | 0.041 | 0.043 | 0.034 | | |
| 回収率 (河川水 / 精製水) | % | 100 | 110 | 116 | 91.8 | | |

*原水にメタノールを加え、50%メタノール溶液として定量しているため、
原水中の濃度は、定量値を 2 倍した値となる

表 5.2.6.4 添加回収試験結果(GC/MS 法)

| 項目 | 単位 | 試験用試料溶液 | | | |
|------------------|------|---------|-------|-------|-------|
| | | 大森橋 | 小塩橋 | 新瑞橋 | |
| 調整濃度(原水) | μg/L | 0.04 | 0.04 | 0.04 | |
| 実測回数 | 回 | 3 | 3 | 3 | |
| 定量値 μg/L | 1 | - | 0.018 | 0.030 | 0.033 |
| | 2 | - | 0.021 | 0.029 | 0.027 |
| | 3 | - | 0.022 | 0.030 | 0.027 |
| 平均値 | μg/L | 0.020 | 0.030 | 0.029 | |
| 変動係数 | % | 10.6 | 0.93 | 12.2 | |
| 回収率 (河川水/精製水) | % | 51.3 | 75.4 | 73.5 | |

評 価

3地点の原水中のPBDE-47をELISA、GC/MS法で定量したところ、いずれの方法でも、検出下限値未満であった。そのため、原水に0.04μg/LとなるようにPBDE-47を添加し、その回収率を求めた。回収率はELISA法で91～116%、GC/MS法で51～75%となり、ELISA法による回収率の方が良好な結果を示した。

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 項目の全ての結果から、0.025 ~ 1.0 μ g/L の濃度範囲において、申請者製品データと比較して、ほぼ妥当な製品性能の信頼性を確認した。

(2) 一般環境モニタリングでの実用性

河川水に定量下限値付近の低濃度(0.04 μ g/L)の PBDE-47 を添加した実験において、良好な回収率を示した。環境水中の PBDE 濃度は、低濃度であるため、適切な前処理を行えば実用化が可能である。また、底質・母乳などの PBDE の検出が報告されている媒体での知見を蓄積することにより、より有効な測定キットと期待される。

(3) 製品操作等の簡便性

本キットの利点としては、迅速に(2時間:前処理を含まない)多試料(13試料:3重測定)の環境試料を同時に定量することが可能な点、マイクロプレートリーダーを必要とせず吸光度計があれば測定可能である点などが挙げられる。一方、欠点としては、吸光度測定に時間を要することから、多検体をこなす場合、酵素基質添加から吸光度測定に至るまで、厳密な時間管理を行わないと真値からのずれが大きくなる恐れがある点が挙げられる。

また、キット付属取扱説明書は、英語で書かれているが、メーカーのホームページには、取扱ビデオ映像がアップされているので、ほぼ間違えることなく実施可能である。

(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 | 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》ポリ臭化ジフェニルエーテル（PBDE）ELISA キット（マグネティック・パーティクル） |

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)

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

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 |
| キット間再現性試験 | 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 4) | 1 6 |
| 付録 3 : 取扱説明書 | 2 3 |
| 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 | 日本エンバイロケミカルズ株式会社 |
| | 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 |
| | 担当者所属・氏名 | 事業開発室 室長 道正 伸 |
| | 電話番号 | 03-5444-9891 |
| | FAX 番号 | 03-5444-9860 |
| | E-mail アドレス | eco@jechem.co.jp |

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。

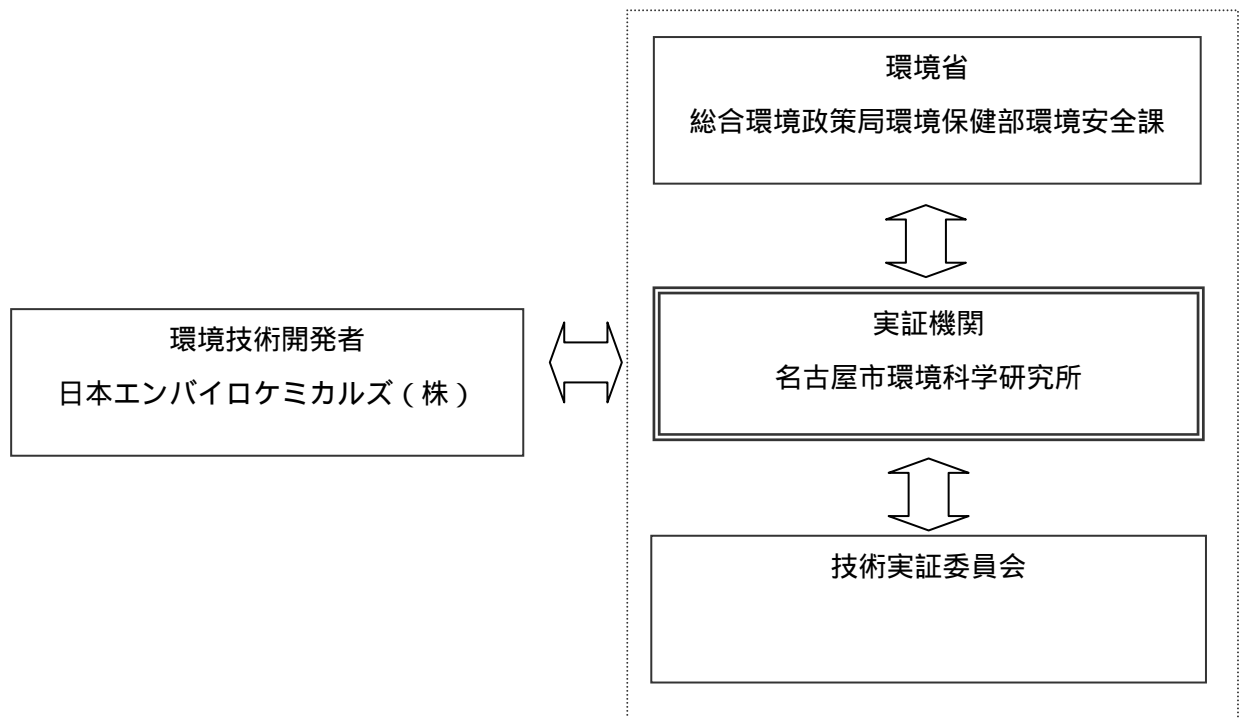


図 2.2 実証試験の実施体制

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 | 水質部研究員 | 山守 英朋 |
| | 実証試験における ELISA 法担当者 | ダイキシン分析センタ - 研究員 | 鈴木 直喜 |
| | 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 | 渡辺 正敏 |
| | 実証試験における機器分析担当者 | ダイキシン分析センタ - 主任研究員 | 大場 和生 |
| | 実証試験における機器分析担当者 | 〃 研究員 | 鈴木 直喜 |
| | 実証試験における精度・技術管理者 | ダイキシン分析研 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 | 大気騒音部 研究員 | 中島 寛則 |
| 環境技術開発者 | 実証対象製品の提供 | 事業開発室室長 | 道正 伸 |
| | 実証対象製品の取扱説明書等の提供 | 研究開発部 リサーチマネージャー | 藤本 茂 |
| | 実証試験実施上の参考情報の提供 | 研究開発部 リサーチマネージャー | 藤本 茂 |

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、ポリ臭化ジフェニルエーテル（PBDE）に対する特異的なポリクロール抗体を応用した、環境中（対象環境媒体：水質、底質、生物）のPBDE測定ELISAキットである。

ELISAの原理は、競合反応（PBDE濃度が高い試料では吸光度が低く、PBDE濃度が低い試料では吸光度が高い）で、マグネティック・パーティク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 | ポリ臭化ジフェニルエーテル（PBDE）ELISAキット（マグネティック・パーティクル） |
| 型番 | 《販売元コード》未定（製造元コード：PN500090） |
| 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（キット一式、g） | 1,300g |
| 価格（円） | 未定 |
| 分析対象物質 | ポリ臭化ジフェニルエーテル |
| 対象環境媒体 | 水質・底質・生物・その他（土壌・穀物）水試料以外は抽出操作が必要。 |
| 利用用途 | 環境水（地下水、表流水、飲料水）、土壌・底質、魚類細胞、等のモニタリング |
| 標準試薬・種類 | 付属（調製済/調製要）PBDE-47 0,0.025,0.05,0.1,0.5,1.0ppb 各50%メタノール溶液 |
| 操作環境（室温） | 15 ~ 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（最多） | 40試料（n=2で1キット使用時） |
| 測定時間 | 1.1時間（固相抽出等の試料の前処を除く） |

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 | 0.025 ~ 1 μ g/L (添付資料 : PBDE-1) |
| 検出下限及び定量下限 | 検出下限 : 0.020 μ g/L 定量下限 : 0.025 μ g/L |
| 繰返し再現性 | 標準偏差 : 0.006 変動係数 : 2.74% |
| 日間再現性 | 標準偏差 : 0.0021 変動係数 : 2.2% |
| 期間再現性 | 標準偏差 : 0.0045 変動係数 : 4.74% |
| キット間再現性 | 標準偏差 : 0.02 変動係数 : 3.89% |
| 交差反応性 | 類縁体等との交差反応性 (添付資料 : PBDE-2) |
| その他 | 魚類細胞測定時の GC/MS との相関性 : R = 0.872 |
| 2 . 実用的な性能 | |
| 回収特性 | 環境水 (水道原水、井戸水 = 飲料水、池、配水路) への添加回収実験結果 (添付資料 : PBDE-3) |
| 測定精度等 | |
| その他 | |
| 試験責任者 | Barbara Hughes (QA Manager) |
| 試験年月日 | 平成 17 年 8 月 30 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 11 月中旬～平成 17 年 1 月初旬とする。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 | | 4 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 | | | | | | | | | |
| キット間再現性の検討 | | | | | | | | | |
| 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)キット間再現性 | 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キット間での 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 (PBDE)」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の希釈濃度系列を使用する。

ウ．吸光度の測定

吸光度は、ハンディフォトメーター (Model-6, アヅマックス社製) 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

試験管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

ポリ臭化ジフェニルエーテル（PBDE）の市販標準物質（PBDE Standard Solution PBDE47：和光純薬製）を用いて、50%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（ $\mu\text{g/L}$ ） |
|-----------------------------------|--|---|
| 標準溶液指定濃度系列 | ポリ臭化ジフェニルエーテル（PBDE-47） | 0, 0.025, 0.05, 0.10, 0.5, 1.0 |
| 測定範囲 日間再現性 期間再現性 キット間再現性 | ポリ臭化ジフェニルエーテル（PBDE-47） | 0, 0.025, 0.05, 0.10, 0.5, 1.0 |
| 検出下限 1・2 及び定量下限 | ポリ臭化ジフェニルエーテル（PBDE-47） | 0, 0.025 |
| 繰返し再現性 | ポリ臭化ジフェニルエーテル（PBDE-47） | 0.10 |
| 交差反応性 | PBDE Congener99 PBDE Congener28 PBDE Congener100 | 0.025, 0.05, 0.10, 0.5, 1.0 0.05, 0.10, 0.20, 1.0, 5.0 0.10, 0.5, 5.0, 10, 50 |

測定範囲試験

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

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

検出下限及び定量下限試験

測定範囲の下限付近に調製した試験溶液を 8 回測定し、その実測濃度より標準偏差（SD）を求める。求めた SD から 3SD 及び 10SD をそれぞれ検出下限及び定量下限とし、申請データと比較検討する。なお、この場合の検出下限値を検出下限 1 とする。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 およ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試験管を用いて「測定範囲試験」と同じ測定操作を行う。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、3日間の比較から日間再現性について検討する。

期間再現性試験

同ロット(製造年月日が同じ)のキットの試験管を用いて、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、キット間の比較から期間再現性について検討する。

キット間再現性試験

同一ロット2キット及び異なるロット1キットの3キットを用いて、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キット間再現性について検討する。

交差反応性試験

ポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE-47)及び類似物質(PBDE Congener99, PBDE Congener28, PBDE Congener100)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。(ポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE-47)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(ポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE-47))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：ポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE-47) | 0.1 μ g/L |
| 妨害物質：フミン酸ナトリウム | 0, 1, 5, 10, 50 mg/L |

測定精度試験

3地点から採取した河川水について、グラスファイバーフィルターによるろ過及び必要に応じて固相抽出による前処理操作を行って測定する。

河川水中からはポリ臭化ジフェニルエーテルは検出されていないことから、ポリ臭化ジフェニルエーテル標準液(PBDE-47)を添加して、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

抗原抗体反応を応用した本技術は、迅速で経済的なオンサイトでの半定量キットとして、あるいはラボでの精密な定量キットとして使い分けることができる。

この技術は簡便な前処理で多数のサンプルを同時に測定でき、有害な有機溶媒も使用しない。

学会発表

Development of a Sensitive Magnetic Particle Immunoassay for Polybrominated Diphenyl Ethers. Paper presented at the 2005 Dioxin Conference, held in Toronto Canada on 8/22/05(添付資料: PBDE-4)

2. その他

環境モニタリングへの適用性、将来の発展性、今後の取組等を記入して下さい。

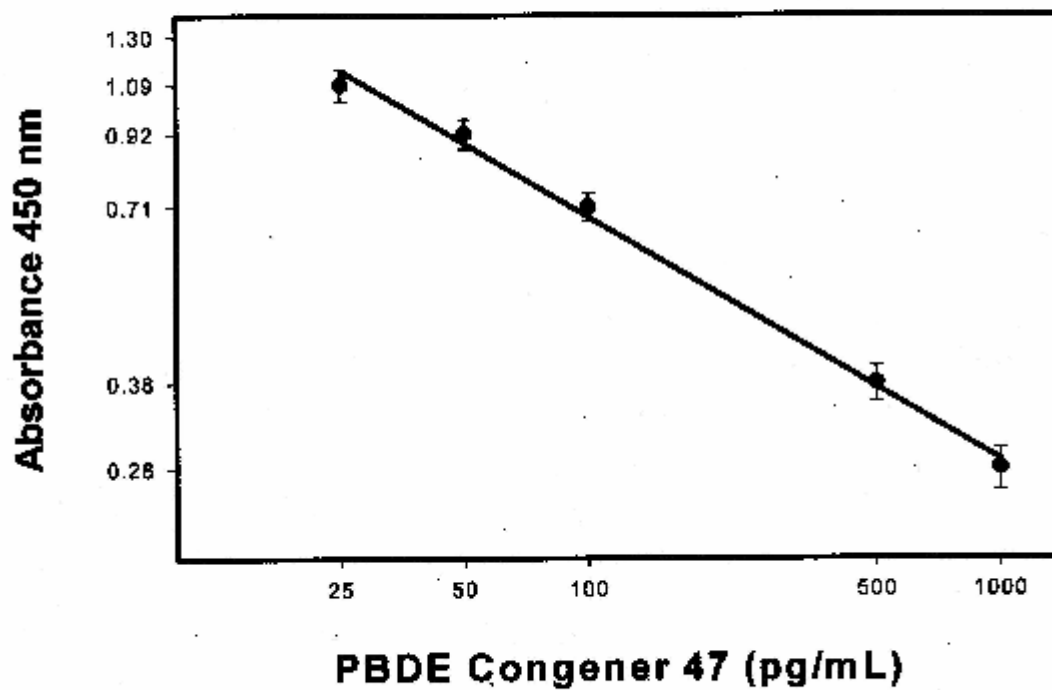
今後の取り組み

- ・ 生体資料(母乳)への適用を検討中。

付録2 環境技術者による性能試験結果

添付資料 PBDE-1

1-① 測定範囲



定量範囲 : 0.025 ~ 1 μ g/L

添付資料 PBDE-2

1-⑦ 交差反応性

(B/B₀=90%から算出した検出下限および阻害率50%となるのに必要な濃度の2通りで表現しています。)

| LDD50% B/Bo Compound | (ppb) | (ppb) |
|----------------------------------|---------|---------|
| PBDE Congener 47 | 0.017 | 0.135 |
| PBDE Congener 99 | 0.02 | 0.15 |
| PBDE Congener 28 | 0.045 | 0.9 |
| PBDE Congener 100 | 0.055 | 5.5 |
| PBDE Congener 153 | 0.075 | 10 |
| PBDE Congener 154 | 3.5 | 580 |
| PBDE Congener 183 | 13.5 | 2000 |
| PBDE Congener 209 | 370 | 3000 |
| 2,2',4,5' Tetrabromobiphenyl | 6.6 | 250 |
| 2,2',4,4',5,5' Hexabromobiphenyl | 130 | >1000 |
| 2,4',5 Tribromobiphenyl | 160 | 2600 |
| 2,2',5 Tribromobiphenyl | 175 | 2900 |
| 2,4,5 Tribromobiphenyl | 240 | 3200 |
| 2,2',4,5',6 Pentabromobiphenyl | 320 | >1000 |
| 3,3',4,4',5,5' Hexabromobiphenyl | >1000 | >1000 |
| 2,2',4,4',6,6' Hexabromobiphenyl | >1000 | >1000 |
| Decabromobiphenyl | >1000 | >1000 |
| PCB Aroclor 1254 | 3 | 180 |
| PCB Congener 37 | 160 | 2000 |
| PCB Congener 77 | >1000 | >1000 |
| 2,2',4,4' Tetrachlorobiphenyl | 16 | 360 |
| 2,2',4,4',5 Pentachlorobiphenyl | 54 | 1500 |
| PCP | 3300 | >10,000 |
| 2-4-D | >10,000 | >10,000 |

The following compounds demonstrated no reactivity in the PBDE RaPID Assay at concentrations up to 10,000 ppb: Biphenyl, 2,5-Dichlorophenol, 2,3,5-Trichlorophenol, Di-n-octyl-phthalate.

添付資料 PBDE-3

2-① 回収特性

環境水への添加回収実験

環境水4サンプル（水道原水、井戸水=飲料水、池、配水路から採取）への添加回収実験結果。

| PBDE 添加量 (ppt) | 回収実験 | | |
|-------------------|-----------|------------|---------|
| | 平均値 (ppt) | 標準偏差 (ppt) | 回収率 (%) |
| 62.5 | 56.4 | 2.87 | 90.2 |
| 125 | 131.5 | 5.30 | 105.2 |
| 250 | 270.6 | 12.8 | 108.3 |
| 500 | 510.4 | 28.32 | 102.1 |
| Average | | | 101.4 |

Development of a sensitive magnetic particle immunoassay for polybrominated diphenyl ethers

Fernando Rubio¹, Carmen D Parrotta¹, Qing X Li², Weilin L Shelver³, Fernando Rubio¹

¹Abraxis Llc

²Department of Molecular Biosciences and Bioengineering, University of Hawaii at Manoa

³USDA-ARS Biosciences Research Laboratory

Introduction

Polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixtures are manufactured as flame retardant additives for electronic equipment, plastics and textiles¹. Three types of commercial PBDE mixtures find wide application², namely "pentaBDEs", "octaBDEs", and "decaBDEs". The penta formulation consists of a mixture of PBDE congeners that includes³ BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153, and BDE-154. The octa formulation consists primarily of BDE-183, while the deca formulation consists primarily of BDE-209. North America accounts for approximately 98% of the global demand for the penta formulation⁴.

PBDEs are ubiquitous environmental contaminants, their bioaccumulation has led to the detection of PBDEs in many species of wildlife⁵, human blood plasma⁶ and in human mother's milk⁷. PBDEs are structurally similar to polychlorinated biphenyls (PCBs), polychlorinated dibenzodioxins (PCDDs), and thyroid hormones, and therefore may interfere with thyroid hormone homeostasis⁸. Because of their potential health consequences it is desirable to have a rapid and high throughput assay to monitor PBDEs.

The quantification of PBDE samples is usually done by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) or GC/high resolution MS (GC/HRMS). While these methods are reliable, they are sophisticated and require extensive purification using large volumes of extraction solvents. The analysis of large numbers of samples using these techniques is not feasible. Therefore, a rapid, simple, and cost-effective method for the screening and quantitative analysis of PBDEs is required. Rapid, sensitive, accurate, and cost-effective enzyme immunoassays (ELISAs), have provided the analytical chemist an alternative tool to traditional instrumentation methods.

Magnetic particle-based ELISAs have previously been described and widely applied to the detection of pesticides and other environmental contaminants⁹⁻¹¹ in various sample matrices, including water, soil, produce, and fish tissue. The uniform dispersion of the particles throughout the reaction mixture allows for rapid reaction kinetics, precise addition of antibody and superior analytical sensitivity. This paper describes the assay performance of a PBDEs magnetic particle-based ELISA in ground water.

Materials and Methods

Carboxy terminated superparamagnetic particles of approximately 1 μm diameter were obtained from Seradyn (Indianapolis, IN). N-hydroxysuccinimide (NHS) and 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide (EDAC) were purchased from (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Rabbit anti-PBDEs serum #122 was produced by immunizing the rabbit with 4-(2, 4-dibromo-5-(2, 4-dibromophenoxy)phenoxy)butyrate-BSA in according to Shelver et al.¹². The PBDE ligand and horse radish peroxidase (HRP) were conjugated via NHS and EDAC reaction to yield PBDEs-HRP conjugate (Abraxis, Warminster, PA). TMB peroxidase substrate was purchased from BioFx (Randallstown, MD). PBDEs, PCBs, PCP and 2, 4-D were obtained either from Chem Service, West Chester, PA or AccuStandard, New Haven, CT).

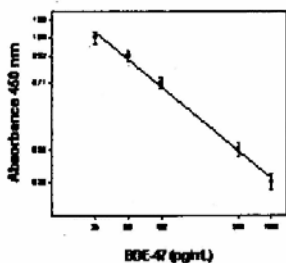
The anti-PBDEs coupled magnetic particles were prepared by NHS/EDAC activation, according to the procedure supplied by Seradyn. The unbound NHS/EDAC was removed from the particles by magnetic separation and washing two times with 50 mM of 2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid (MES) buffer (pH 6.0). The PBDE antiserum and the activated particles were incubated overnight at room temperature with agitation. The reaction was then quenched with glycine buffer and the covalently coupled anti-PBDEs particles were washed and diluted with a Tris-saline/BSA

preserved buffer.

During the assay procedure, magnetic separation was performed using a magnetic separation rack (Abraxis, Warminster, PA). The device consists of a magnetic separation rack and a test tube holder, which fits over a magnetic separation rack containing permanent rare earth magnets. The two-piece design allows for up to sixty tubes to be set up, incubated and magnetically separated without removing the tubes from the tube holder.

Water samples were analyzed directly without any sample extraction or pre-concentration. After mixing 1:1 with methanol, 250 mL of the sample and anti-PBDE coupled magnetic particles (500 mL) were added to a disposable glass test tube and incubated for 20 minutes at room temperature. An aliquot of PBDE-HRP solution (250 mL) was added and the reaction was incubated for 20 minutes at room temperature. A magnetic field was applied to the magnetic solid-phase to facilitate washing and removal of unbound PBDE-HRP and to eliminate any potential interfering substances. The enzyme substrate and chromogen (peroxide/TMB) were then added (500 mL) and incubated for 20 minutes. The reaction is stopped with the addition of 2 N H₂SO₄ (500 mL) and the final color was read with analyzed using a photometer by determining the absorbance at 450 nm. The observed absorbance data were compared to a linear regression line using a log-log standard curve prepared from calibrators containing 0, 25, 50, 100, 500 and 1,000 parts per trillion (ppt) of BDE-47.

Results and Discussion



Dose Response Curve and Sensitivity. Figure 1 illustrates the mean standard curve for the BDE-47 calibrators collected over 24 assays, error bars represent one standard deviation (SD, n=24). The displacement at the 25 ppt level is significant (84% B/Bo, where B/Bo is the absorbance at 450 nm observed for a sample or standard divided by the absorbance at the zero standard). The assay sensitivity in water based on 90% B/Bo is 17 ppt.

Precision. Table 1 shows the results from a precision study in which surface and groundwater samples fortified with BDE-47 at 3 concentrations were each measured 5 times per assay and on five different days. The within and between day variation was estimated by the method of Bookbinder and Panosian¹³. Coefficients of variation below 5% were observed.

Table 1 Table 2

Precision of BDE-47 Measurements in Water BDE-47 Recovery in Water

| Conc. of BDE-47 Added (ppt) | Recovery | | |
|-----------------------------|------------|------------|-------|
| | Mean (ppt) | S.D. (ppt) | % |
| 62.5 | 56.4 | 2.9 | 90 |
| 125 | 131.5 | 5.3 | 105 |
| 250 | 270.6 | 12.8 | 108 |
| 500 | 510.4 | 28.3 | 102 |
| Average | | | 101.4 |

| Control | 1 | 2 | 3 |
|----------------------|-----|-----|-----|
| Replicates | 5 | 5 | 5 |
| Days | 5 | 5 | 5 |
| n | 25 | 25 | 25 |
| Mean (ppt) | 47 | 95 | 514 |
| % CV (within assay) | 3.2 | 2.2 | 2.0 |
| % CV (between assay) | 4.4 | 4.8 | 4.0 |

Accuracy. Known amounts of BDE-47 were added to four groundwater samples obtained from Warminster, PA. The samples included a municipal water source, a reservoir, a lake, a pond,

and a creek. The accuracy (recovery) was assessed by analyzing the samples before and after the addition of BDE-47 and then subtracting the estimated concentration of PBDE before spiking. None of the samples had significant levels of PBDEs. Added amounts were accurately recovered (Table 2). An average assay recovery of 101% was obtained.

Table 3

Specificity (Cross-Reactivity)

| Compound | LDD (ppb) | 50% B/Bo (ppb) |
|--------------|--------------|-------------------|
| BDE -47 | 0.017 | 0.135 |
| BDE-99 | 0.02 | 0.15 |
| BDE -28 | 0.045 | 0.9 |
| BDE 100 | 0.055 | 5.5 |
| BDE 153 | 0.075 | 10 |
| BDE 154 | 3.5 | 580 |
| BDE -183 | 13.5 | 2000 |
| BDE -209 | 370 | 3000 |
| Aroclor 1254 | 3 | 180 |
| PCB-37 | 160 | 2000 |
| PCB-77 | >1000 | >1000 |
| PCP | 3300 | >10,000 |
| 2,4-D | >10,000 | >10,000 |

Specificity. Table 3 summarizes the cross-reactivity data of the PBDE assay for various PBDE congeners as well as other environmental contaminants such as PCBs, PCP, and 2,4-D. The percent cross-reactivity was determined by estimating the amount of analogue required to displace 50% of the enzyme conjugate and comparing to the 50% displacement of the BDE-47 standard curve. The results showed that the antibody recognizes BDE-47 and BDE-99 equally well, the higher the brominate substitution the less cross-reactivity was observed. The antibodies have less than 0.1% cross-reactivity for Aroclor 1254.

Conclusions

This work describes the performance characteristics of a magnetic particle-based ELISA for the detection of PBDEs in groundwater samples. The assay is fast, and eliminates the need for expensive instrumentation and solvent disposal. The ELISA exhibits good precision and accuracy which can provide consistent and cost-effective monitoring of water

samples. Using this ELISA, fifty results can be obtained in about one hour. Future efforts will be to extend these observations to the analysis of other type of matrices such as food, serum, milk, soil, and to perform comparison with other analytical methods.

Acknowledgements

The authors would like to thank Amy McGarvey for technical assistant.

References

1. IPCS (1994). Environmental Health Criteria 162: Brominated diphenyl ethers. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva.
2. Hardy, M.I. *Chemosphere* **2002**, *46*, 757-777.
3. deWitt, C.A. *Chemosphere* **2002**, *46*, 583-624.
4. Boon, J.P.; Lewis, W.E.; Tjoen-A-Choy, M.R.; Allchin, C.B.; Law, R.J.; De Boer, J.; Hallers-Tjabbes, C.C.; Zegers, B.N.; *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *46*, 697-707.
5. Anderson, O., and Blomkvist, G. *Chemosphere* **1981**, *10*, 1051-1060.
6. Klasson Wehler, E.; Hovander, L.; Bergman, A. *Organohalogen Compd.* **1997**, *33*, 420-425.
7. Meiroyte, D.; Noren, K; Bergman, A. *J. Toxicol. Environ. Health.* **1999**, *58*, 329-341.
8. Brouwer, A.; Morse, D.C.; Lnas, M.C.; Schuur, A.G.; Murk, A.J.; Klasson-Wehler, E.; Bergman, A., and Visser, T.J. **1998**, *Toxicol. Ind. Health*, *14*, 59-84.
9. Hottenstein, C.S.; Fleeker, J.R; Herzog, D.P.; Rubio, F.M.; Lawruk, T.S. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1996**, *44*:3576-358.
10. Jourdan, S.W.; Scutellaro, A.M; Fleeker, J.R.; Herzog, D.P.; Rubio, F.M. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1995**, *43*:2784-2788.
11. Lawruk, T.S.; Gueco, A.M.; Jourdan, S.W.; Scutellaro, A.M.; Fleeker, J.R.; Herzog, D.P.; Rubio, F.M. *Journal of Wine Research* **1994**, *5*:205-214.
12. Shelver, W. L., Keum, Y. -S., Kim, H. -J., Rutherford, D., Hakk, H., Bergman, D., and Li, Q. X. *J. Agri. Food*

ANA - Bioanalytical Approaches for POPs Detection

Chem. **2005** (web release: April 15, 2005)

13. Bookbinder, M.J.; Panosian, K.J. Correct and Incorrect Estimation of Within and Between-day Variation. *Clin. Chem.* **1986**, *32*:1734-1737.

ポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE) ELISA キット(マグネティック・パーティクル)・使用説明書

●はじめに

本製品はポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE)を分析するキットです。各種環境水(地下水、表流水、井戸水、処理水、など)を分析する場合は、別添の使用方法もご参照ください。土壌や生体試料など他のマトリクスを測定する場合はお問い合わせください。

●測定原理など

ポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE) ELISA キット(マグネティック・パーティクル)は酵素免疫測定法(ELISA)を原理としたPBDE分析キットです。測定試料を抗PBDE抗体を固定化した磁気微粒子(マグネティック・パーティクル)溶液と試験管内で混合し、これに抗原酵素複合体溶液を加えると、試料中のPBDEと抗原酵素複合体の間で、磁気微粒子に固定化した抗体の結合部位を奪い合う競争反応が起こります。20分間の競争反応の後、磁気で磁気微粒子を試験管壁面に吸着させた状態で、抗体に結合しなかったPBDEや抗原酵素複合体を洗浄液で洗い流します。(このとき、もともと溶液中の存在比で、PBDEと抗原酵素複合体が磁気微粒子上の抗体に結合しています。)

試料中のPBDEは酵素基質(過酸化水素)と水素供与体(3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン)からなる発色液(Color Solution)により検出されます。(PBDE抗体に結合した抗原酵素複合体が発色液を着色させます。)20分の発色反応時間の後に発色停止液(Stopping Solution)の添加により発色反応を止め、着色を安定化させます。この発色に寄与する抗原酵素複合体は、試料中の抗原(PBDE)との競争反応のすえ抗体に結合したもので、着色度は試料中のPBDE濃度に反比例する結果となります。

●試薬

ポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE) ELISA キット(マグネティック・パーティクル)には以下の試薬が含まれています。

抗PBDE抗体固相化磁気微粒子(PBDE Antibody Coupled Paramagnetic Particles)

抗PBDE抗体(ウサギ)を共有結合した磁気微粒子懸濁液(ベース:防腐剤と安定剤を含有した緩衝溶液)
100テスト分:60mL

抗原酵素複合体溶液(PBDE Enzyme Conjugate)

西洋ワサビペルオキシターゼ溶液(ベース:防腐剤と安定剤を含有した緩衝溶液)
100テスト分:30mL

PBDE標準液(PBDE Standards)

標準液 0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0ppb PBDE(#47)メタノール溶液(ベース:防腐剤と安定剤を含有したメタノール50%溶液)
100テスト分:各2mL

コントロール(Control)

PBDE 0.25ppb 溶液(ベース:防腐剤と安定剤を含有したメタノール50%溶液)
100テスト分:2mL

希釈液/ゼロ標準液(試料希釈液)(Diluent/Zero Standard (Sample Diluent))

PBDEや抗体への交差反応物質を含まない防腐剤と安定剤を含有したメタノール溶液
100テスト分:35mL

発色液(Color Solution)

過酸化水素と3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン溶液(ベース:有機溶剤)
100テスト分:65mL

発色停止液(Stopping Solution)

0.5%希硫酸
100テスト分:60mL

洗浄液T(Washing Solution T)

洗浄剤を含有した蒸留水
100テスト分:250mL

試験管(Test Tubes)

ガラス製使い捨て試験管
100テスト分:36本入り(3箱)

●試薬の保存と安定性

全ての試薬を2-8℃で保存してください(冷凍厳禁)。試薬はキット箱記載の使用期限までにご使用ください。キット添付の試験管は冷蔵保存の必要がありませんから、冷蔵スペースを有効利用するためにも、別の場所に保存してください。

試薬の廃棄については、所定の法定規則に従ってください。

●必要な器具や試薬(キットに含まれないもの)

キットに含まれる試薬以外に、以下の器具や試薬が必要になります。

- ・マイクロピペット(250, 500 μ L が秤量可能なもの)
- ・分注ピペット(1mL が秤量可能なもの)
- ・ボルテックスミキサー
- ・マグネティックセパレーションラック(Magnetic Separation Rack)
- ・吸光度計(450nm を読み取り可能なもの)
詳しくはお問い合わせください。

●測定試料について

水試料については別添の取り扱い説明書をご参照ください。その他の試料についてはお問い合わせください。

モノクロ酢酸や他の酸で保存されている試料は6N水酸化ナトリウム等の強塩基で中和してください。

試料中のPBDE濃度が1.0ppb以上の場合には試料を希釈して再測定してください。この場合、キット添付の希釈液/ゼロ標準液(試料希釈液)(Diluent/Zero Standard (Sample

Diluent))で10倍またはそれ以上の希釈を推奨します。(例えば、別の試験管に900 μ Lの希釈液を取り、そこに100 μ Lの試料を添加し完全に混合してください。測定方法に従い測定し、得られた結果を希釈倍率で掛け戻してください。)

以下の物質が1%以上試料中に混在しても、測定結果に影響を与えません。

窒素、リン、硫黄、フッ素、カリウム、マグネシウム、銅、亜鉛、鉄、ナトリウム

フミン酸および硫酸鉄は100ppmまで影響を受けません。

●試薬の調製

全ての試薬を使用前に室温にもどしてください。抗PBDE体抗固相化磁気微粒子(PBDE Antibody Coupled Paramagnetic Particles)は使用前に完全に混合してください。

●ご使用に関する注意等

他のイムノアッセイ同様、首尾一貫したピペット操作が満足な測定結果を得るための鍵となります。測定精度を最も高めるために、どの試験管に対しても全く同じ操作を行ってください。

試薬とピペットチップが接触しないことに注意しながら、試薬類はウェルや試験管の底に直接添加してください。

試薬相互のコンタミや直前に使用した試薬の混入を防ぐため、各試料の添加にはそれぞれ新しいピペットチップを使用し、先に入れた試薬とピペットチップが接触しないよう注意してください。

ボルテックスミキサーでの攪拌時に気泡が生じないように注意してください。

マグネティックセパレーションラック(Magnetic Separation Rack)は2つのパーツから構成されています。上部は試験管を保持するためのパーツで、下部は強力磁石を内包しており抗体を固定化した磁気微粒子を引き付ける役割を果たします。各反応工程では、上部パーツを下部から引き離してください。そうすることで、反応中溶液中の磁気微粒子を均一に保つことができます。洗浄工程では上部と下部のパーツを重ね合わせ、磁気微粒子を試験管壁面に吸着させます。(下部パーツを使用するのは、洗浄時のみです。)

測定精度を高めるため、洗浄工程には十分に注意を払い、常に同じリズムで行ってください。セパレーションラックを作業者から遠い位置に持ち、ゆっくりと反転させてデカント(上澄み液の分離=廃棄)を行ってください。このとき巧みに動作を反転させることにより、試験管の一方のみを伝って液体が流出するようになれば効果的です。ラックを反転させた状態で試験管先をウエス等に接触させ、試験管先の液滴を取ることができます。このとき、ラックをウエス等から離し、また押し付ける動作を数回繰り返すことにより、より効果的に

のキットには濃度既知 (0.25ppb) のコントロールが添付されています。測定時にコントロールも加え、測定値のずれを精度管理に利用することができます。

● **使用方法**

試薬の調製やご使用に関する注意等をよくお読みください。

1. 環境水試料については、別添の水試料に関する取り扱い説明書をご参照ください。水以外のマトリクスについては、お問い合わせください。
2. キット添付のガラス試験管に標準液、コントロール、サンプル名を印字してください。

<一例>

| 試験管 No. | 添加試薬や試料 |
|---------|------------------|
| 1,2 | 希釈液/ゼロ標準液, 0 ppb |
| 3,4 | 標準 1, 0.025 ppb |
| 5,6 | 標準 2, 0.05 ppb |
| 7,8 | 標準 3, 0.1 ppb |
| 9,10 | 標準 4, 0.5 ppb |
| 11,12 | 標準 5, 1.0 ppb |
| 13 | コントロール |
| 14 | 試料 1 |
| 15 | 試料 2 |
| 16 | 試料 3 |

3. 250 uL の PBDE 標準液 (PBDE Standards)、コントロール (Control)、試料を 2. で印字した試験管に入れてください。
4. 抗 PBDE 体抗固相化磁気微粒子 (PBDE Antibody Coupled Paramagnetic Particles) を攪拌して完全に均一化してから、500 uL を各試験管に入れてください。
5. 泡立に注意しながらボルテックスミキサーで 1~2 秒攪拌してください。
6. 室温で 20 分間放置して抗原抗体反応を行ってください。
7. 250 uL の 抗原酵素複合体溶液 (PBDE Enzyme Conjugate) を各試験管に入れてください。
8. 泡立に注意しながらボルテックスミキサーで 1~2 秒攪拌してください。
9. 室温で 20 分間放置して競争反応を行ってください。
0. マグネティックセパレーションラックの両パーツをセットして、2 分間放置して固液分離を行ってください。
1. 一定の動作でセパレーションラックを反転させ、デカント (上澄み液の分離=廃棄) を行ってください。
2. 1mL の 洗浄液 T (Washing Solution T) を各試験管に加え、ボルテックスミキサーで 1~2 秒攪拌してください。セパレーションラックの両パーツをセットして、2 分間放置して (固液分離) を行ってください。
3. 一定の動作でセパレーションラックを反転させ、デカント (上澄み液の分離=廃棄) を行ってください。
4. 12. と 13. のステップを再度実施してください。
5. セパレーションラックの上部 (試験管保持部分) を外し、500 uL の 発色液 (Color Solution) を各試験管に加えてください。

16. 泡立に注意しながらボルテックスミキサーで 1~2 秒攪拌してください。
17. 室温で 20 分間放置して発色反応を行ってください。
18. 500uL の 発色停止液 (Stopping Solution) を各試験管に加えてください。
19. 新しい試験管に 1mL の 洗浄液 T (Washing Solution T) を入れ、ステップ 20. の ブランク (リファレンス) に使用してください。
20. 発色停止液を入れてから 15 分以内に吸光度 (450 nm) を測定してください

● **測定結果の算出方法**

手計算

1. 各標準液の吸光度の平均値を計算してください。
2. ゼロ標準の平均吸光度で各平均吸光度を割った値 (B/B₀) を計算してください。
3. キット添付の片対数グラフに B/B₀ (Y 軸: リニア) と各標準濃度 (x 軸: 対数) をプロットし、検量線を作成してください。
4. コントロールと試料の B/B₀ を検量線に参照して各濃度を読み取ってください。

● **性能試験データ (Abraxis 社実施例)**

感度

ポリ臭化ジフェニルエーテル (PBDE) ELISA キット (マグネティック・パーティクル) の検出下限は 0.017ppb です (B/B₀=90% で算出)。

特異性 (交差反応性)

ポリ臭化ジフェニルエーテル (PBDE) ELISA キット (マグネティック・パーティクル) の関連物質に対する交差反応性は以下の通りです。 (B/B₀=90% から算出した検出下限および阻害率 50% となるのに必要な濃度の 2 通りで表現しています。)

| 化合物 | LDD | 50% B/B ₀ Compound |
|----------------------------------|---------|-------------------------------|
| (ppb) | (ppb) | (ppb) |
| PBDE Congener 47 | 0.017 | 0.135 |
| PBDE Congener 99 | 0.02 | 0.15 |
| PBDE Congener 28 | 0.045 | 0.9 |
| PBDE Congener 100 | 0.055 | 5.5 |
| PBDE Congener 153 | 0.075 | 10 |
| PBDE Congener 154 | 3.5 | 580 |
| PBDE Congener 183 | 13.5 | 2000 |
| PBDE Congener 209 | 370 | 3000 |
| 2,2',4,5' Tetrabromobiphenyl | 6.6 | 250 |
| 2,2',4,4',5,5' Hexabromobiphenyl | 130 | >1000 |
| 2,4',5 Tribromobiphenyl | 160 | 2600 |
| 2,2',5 Tribromobiphenyl | 175 | 2900 |
| 2,4,5 Tribromobiphenyl | 240 | 3200 |
| 2,2',4,5,6 Pentabromobiphenyl | 320 | >1000 |
| 3,3',4,4',5,5' Hexabromobiphenyl | >1000 | >1000 |
| 2,2',4,4',6,6' Hexabromobiphenyl | >1000 | >1000 |
| Decabromobiphenyl | >1000 | >1000 |
| PCB Aroclor 1254 | 3 | 180 |
| PCB Congener 37 | 160 | 2000 |
| PCB Congener 77 | >1000 | >1000 |
| 2,2',4,4' Tetrachlorobiphenyl | 16 | 360 |
| 2,2',4,4',5 Pentachlorobiphenyl | 54 | 1500 |
| PCP | 3300 | >10,000 |
| 2,4-D | >10,000 | >10,000 |

以下の化合物が試料中に 10,000ppb 存在しても本 ELISA キットに反応しないことを確認しています。

ビフェニル、2,5-ジクロロフェノール、2,3,5-トリクロロフェノール、ジ-n-オクチルフタレート

● **お問合せ**

日本エンバイロケミカルズ(株) 事業開発室
〒105-0023
東京都港区芝浦一丁目 2 番 1 号 シーバンス N 館 9F
TEL: 03-5444-9891 FAX: 03-5444-9860
E-mail: eco@jchem.co.jp
URL: http://www.jchem.co.jp

水試料中の PBDE 分析

●用途

各種の水検体(地下水、表流水、井戸水、排水)中のポリ臭化エーテル(PBDEs)の測定

メタノールで 1:1 に希釈した実サンプルあるいはコントロールでは測定濃度値を 2 倍してください。あるいは希釈倍率を自動的に補正できる分析装置の場合には下記の通り設定してください。

| | | | |
|--------------|-------|-------|-------|
| n | 25 | 25 | 25 |
| Mean (ppb) | 0.047 | 0.095 | 0.514 |
| % CV (アッセイ内) | 3.16 | 2.17 | 1.98 |
| % CV (アッセイ間) | 4.35 | 4.78 | 3.97 |

●必要な器具や試薬(キットに含まれないもの)

メタノール(HPLC 用または同等品)

●サンプルの取り扱いについて

サンプルはガラス製容器(フタの内側がテフロン加工されているもの)に捕集してください。採取後速やかにメタノール(HPLC 用)で 1:1 に希釈し、ガラスへの吸着を防いでください。

希釈後も ss 分を含む試料はろ過し、大粒子を除去してください(ろ材の一例: 0.2 μ m Anotop™ 25 Plus, Whatman, Inc.)。

●測定にあたっての注意事項

水試料を上記の通り準備してください。測定は PBDE キットに同封されている使用説明書に従ってください。

イムノアッセイでは一定した測定手技が求められます。測定精度を確保するためにチューブ一本一本をできるだけ同じ操作・要領で取り扱ってください。

ピペットの先端が他の試薬に触れないよう注意しながら、試験管の底に直接添加してください。

試薬相互のコンタミや直前に使用した試薬の混入を防ぐため、各試料の添加にはそれぞれ新しいピペットチップを使用し、先に入れた試薬の液滴がピペットの先端に接触しないよう注意してください。

●測定データの取り扱い

手計算

- 各標準液の吸光度の平均値を計算してください。
- ゼロ標準の平均吸光度で各平均吸光度を割った値(B/B₀)を計算してください。
- キット添付の片対数グラフに B/B₀ (Y 軸: リニア)と各標準液濃度(x 軸: 対数)をプロットし、検量線を作成してください。
- コントロールと試料の B/B₀ を検量線に参照して PBDE の濃度を読み取ってください。

吸光分析装置

検量線を自動的に作成しデータを保存できる吸光分析装置が各社から販売されています。詳細は測定装置に付属のマニュアルを参照してください。データの換算機能がある機器で PBDE を定量する場合には下記のパラメータの設定を推奨します。

Data Reduct : Lin. Regression
 Xformation : Ln / Ln
 Read Mode : Absorbance
 Wavelength : 450 nm
 Units : PPT
 # Rgt Blk : 0
 Calibrators:
 # of Cals : 6
 # of Reps : 2

Concentrations:
 #1: 0.00 PPT
 #2: 25 PPT
 #3: 50 PPT
 #4: 100 PPT
 #5: 500 PPT
 #6: 1000 PPT

Range : 20 - 1000
 Correlation : 0.990
 Rep. %CV : 10%

●お問合せ

日本エンバイロケミカルズ(株) 事業開発室
 〒105-0023
 東京都港区芝浦一丁目 2 番 1 号 シーバンス N 館 9F
 TEL: 03-5444-9891 FAX: 03-5444-9860
 E-mail: eco@jechem.co.jp
 URL: <http://www.jechem.co.jp>

●性能試験データ(Abraxis 社実施例)

感度

B/B₀ 90%として規定した検出下限は 17ppt (0.017ppb)です。

添加回収

水道原水、上水、井戸水、湖沼水の 4 サンプルに数段階濃度の PBDE をスパイクし、メタノールで 1:1 に希釈して測定した添加回収実験の結果は以下の通りです

| Amount of PBDE Added (ppt) | Mean (ppt) | S.D. (ppt) | Recovery % |
|----------------------------|------------|------------|------------|
| 62.5 | 56.4 | 2.87 | 90.2 |
| 125 | 131.5 | 5.30 | 105.2 |
| 250 | 270.6 | 12.80 | 108.3 |
| 500 | 510.4 | 28.32 | 102.1 |
| Average | | | 101.4 |

精度

下記の結果が得られています。

| Control | 1 | 2 | 3 |
|------------|----|---|---|
| Replicates | 25 | 5 | 5 |
| Days | 5 | 5 | 5 |

