

研究用試薬エコロジーナ®
非イオン界面活性剤
APE ELISA キット
(マイクロプレート)
使用説明書

前文

家庭用洗剤への普及により、非イオン界面活性剤の生産量は陰イオン界面活性剤と同程度にまで増加しています¹⁾。

非イオン界面活性剤の全生産量の約 10%を占め、主に工業用洗剤や分散剤として使用されているポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル(アルキルフェノールエトキシレート; 略称 APE, POEP)は、環境水中での分解により、外因性内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン様物質)であるアルキルフェノール^{2)、3)}を生成する⁴⁾ため、ヨーロッパでは APE を規制する動きがあります⁵⁾。

環境水中の非イオン界面活性剤測定法として、水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法(平成15年7月22日厚生労働省告示第261号、別表第28)には、固相抽出ー吸光光度法(PAR 法)が収載されています⁶⁾。この方法は、AE とアルキルフェノールエトキシレート(APE, POEP)の総量を測定する方法であり、AE と APE の分別定量はできません。また、煩雑なクリーンアップ、有害な有機溶剤(トルエン)による抽出操作が必要なほか、酸化エチレン鎖(EO 鎖)長による感度のばらつきなどの問題が指摘されています⁷⁾。

本品は、酵素免疫定量法(ELISA 法)により、環境水中の APE を高感度かつ簡便に測定できるキットです⁸⁾。



キットの特長

1. モノクローナル抗体を使用しているため、製造ロット間で抗体性能にばらつきがなく、環境水中の APE を特異的に検出・測定できます。
2. 定量範囲は 0.02–1mg/L(ppm)と高感度です。
3. 試料水の前処理はろ過だけで簡単です^{注)}。
4. 測定値の CV(変動係数)は 10%以下で、ばらつきが少なく、高精度です。
5. 有機溶媒の使用量を低減できます。
6. 測定試料の調製から定量まで 2.5 時間で完了します。
7. 多検体同時処理が可能です。

注)測定試料により固相抽出等のクリーンアップ・濃縮が必要な場合があります。

測定原理(競合 ELISA 法)

1. 競合反応

APE(抗原)と特異的に結合するたんぱく質(抗体)が、マイクロプレート内面に塗布(固相化)されています。

前処理した試料水と、APE に発色用酵素(ペルオキシダーゼ)を結合させた抗原酵素複合体(酵素標識抗原)をマイクロプレートに加え、競合反応させます。

2. 発色反応

競合反応後、洗浄により未反応物を除去し、発色基質(過酸化水素、TMB)を加えます。抗体に結合した抗原酵素複合体の発色用酵素のはたらきで発色基質が着色します。APE 濃度が高い試料では、抗原酵素複合体の抗体への結合量が少ないため、着色が弱くなり、吸光度が低くなります。

3. 濃度の定量

450nm での吸光度(着色の度合い)と APE 濃度との関係から標準曲線を作成します。これを用いて、試料中の APE 濃度を定量します。

キット構成内容

No.	品 名	容 量	数 量	保存温度条件
①	抗APEモノクローナル抗体固相化マイクロプレート	96 well	1枚	2～8℃
②	APE標準原液(NP10EO, 4mg/L 20%メタノール溶液)	4mL	1本	2～8℃
③	抗原酵素複合体粉末	7mL用	2本	2～8℃
④	抗原酵素複合体溶解液(白キャップ)	8mL	2本	2～8℃
⑤	6倍濃縮洗浄液	50mL	1本	2～8℃
⑥	発色基質溶液	250 μ L	1本	2～8℃
⑦	発色基質希釈液(赤シール)	15mL	1本	2～8℃
⑧	発色停止液(黒キャップ)	15mL	1本	2～8℃
⑨	混合用マイクロプレート	96 well	1枚	室温
⑩	プレートシール		1枚	
⑪	使用説明書		1部	

＜キットの他に必要な試薬・器材＞

器材例は推奨品であり、弊社で使用可否を確認しておりますが、これらに限定するものではありません。

● 固相抽出による濃縮が必要でないとき ●

- 1 ディスポーザブル培養試験管(例: 岩城硝子社製、品番 9831-1207)
※壁面への吸着を防ぐため、試験管は必ずディスポーザブル品を使用してください。
- 2 ガラス繊維フィルター(例: アドバンテック社製、品番 36481047, ϕ 47mm)およびろ過に必要な器具
- 3 マイクロピペット(20-200 μ L, 200-1000 μ L)(例: キルソンピペットマン P-200, P-1000)
- 4 マルチチャンネルピペット(50-300 μ L) (例: フィンピペットデジタルマルチチャンネル 8 チャンネル)
- 5 プレートリーダー(測定波長 450nm) (例: TECAN サンライズリモート 和光純薬工業(株)取扱い)
- 6 ストップウォッチ(時計)
- 7 ストリップインジェクター(あると便利です) (例: コーニングコースター社製、品番 2578)
- 8 メタノール(高純度品を推奨します)

● 固相抽出による濃縮が必要なとき ●

1-8 は共通

- 9 固相カートリッジ(例: J.T.Baker SPE カラム Octadecyl(C18) Disposable Extraction Columns 6mL, 500mg 和光純薬工業(株)取扱い Code.No.562-20014)
- 10 1M 酢酸緩衝液(pH5)
- 11 固相抽出用器具一式(VAC ELUTE、真空ポンプ、ガラス遠沈管、濃縮装置など)

測定時の一般的注意

- 本キットは、使用前までに室温に戻しておいてください。
- 異なるキットの試薬を組み合わせ使用しないでください。
- 試薬は凍結を避けて 2～8℃で冷蔵保存し、使用期限の過ぎたものは使用しないでください。
- 試薬調製時・測定操作時は、試薬が直接皮膚や目に触れないよう、眼鏡や手術用ゴム手袋などの適切な保護具を使用してください。
- 精度管理のため、繰り返し測定 ($n \geq 2$) を推奨します。

測定法

1. 試料前処理(ろ過など)

濁りのない試料	メタノールを添加し、10%(V/V)メタノール溶液とし、これを検液とします。
濁りのある試料	ガラス繊維ろ紙上でろ過し、ろ紙上の残渣は試料量の 10%のメタノールで洗浄します。 洗浄液をろ液に合わせて 10%(V/V)メタノール溶液とし、これを検液とします。
APE が低濃度の試料	上水試験方法(2001)に準じ、溶出溶媒にメタノール、固相カラムを用いて濃縮し、検液とします。

【固相カラムによる濃縮の例】^(文献 9)

- ① 1M 酢酸緩衝液 (pH5) を用い、試料(ろ液)の pH を 5 に調整します。
- ② メタノールおよび蒸留水であらかじめコンディショニングした固相 (C18) カートリッジに、1) で調製した試料を通水します。試料通水時は、器壁への吸着を避けるため、チュービングの使用は避け、注射筒等を使用することをおすすめします。
- ③ 蒸留水で洗浄後、メタノールにより溶出します。
- ④ 窒素パージ(窒素ガス吹き付け)等により溶媒を除去します。
- ⑤ メタノールに溶解後、蒸留水を加えて、最終メタノール濃度を 10%とします。

※本前処理は、LAS ELISA キットおよび AE ELISA キットと併用可能です。

2. APE 標準液の調製

「②4mg/L APE 標準原液」、メタノールおよび蒸留水を用い、必要な濃度(例: 1.0, 0.1, 0.02, 0mg/L)の APE 標準液(10%メタノール溶液)を調製します。

【調製例】

注) 推奨するマイクロピペット容量の都合上、0.02mg/L での調製液量を 4000 μ L にしています。

調製標準液	(mg/L)	1.0	0.1	0.02	0
メタノール	(μ L)	50	95	396	100
蒸留水	(μ L)	700	880	3584	900
②4mg/L APE 標準原液	(μ L)	250	25	20	0
調製液量	(μ L)	1000	1000	4000	1000

※標準液は必ず使用時に調製してください。保存使用はできません。

※希釈容器は、できるだけディスポーザブル培養試験管をご使用ください。

※APEの壁面への吸着を防止するため、必要な濃度への希釈は必ず段階とし、1) メタノール、2) 蒸留水、3) 「②4mg/L APE標準原液」の順で混合してください。

※標準液調製時はAPEが壁面に付着したり、発泡する場合があります。ポリテックスミキサー等の使用は避け、試験管を強く振らないでください。発泡を避けるため、マイクロピペットを利用し、液中で吸入・排出を2~3回ゆっくりと繰り返して混合してください。

※APE標準原液中のメタノールが揮散しますので、分取後は速やかにフタを固く閉め、冷蔵保存してください。

※使用しなかったAPE標準原液および標準液は回収し、水系に直接廃棄しないでください(例:布や紙で取り、焼却処理)。

※APE濃度0の場合は10%メタノールを調製してください。

3. 抗原酵素複合体溶液」の調製

「③抗原酵素複合体粉末」(1本)に、「④抗原酵素複合体溶解液(白キャップ)」(8mL/本)のうち7mLを加えて溶解し、抗原酵素複合体溶液を調製します。

※抗原酵素複合体溶液は冷蔵保存し、溶解後2週間以内に使用してください。

※マイクロピペットを利用し、液中で吸入・排出を2~3回繰り返して混合してください。

※抗原酵素複合体溶液を2本同時に使用する時は、あらかじめ混合してから使用してください。1本(7mL)で約50well分の測定ができます。

4. 「混合液」の調製

「⑨混合用マイクロプレート」を用い、抗原酵素複合体溶液 100 μ L/well に、測定試料または各濃度の APE 標準液(いずれもメタノール濃度 10%) 100 μ L/well を添加して、混合液を調製します。

※APEの壁面への吸着を防止するため、抗原酵素複合体溶液を先に、測定試料またはAPE標準液を後に分注してください。添加順序を逆にとると、標準曲線を正確に作成できない場合があります。

※マイクロピペットあるいはマルチチャンネルピペットを利用し、液中で吸入・排出を2~3回繰り返して混合してください。また、泡立ちやすいので、分注の際は気泡が入らないようゆっくりと操作してください。

※APE濃度0の場合は10%メタノールを用いてください。

5. 抗原抗体反応(競合反応)

室温に戻した「①抗APEモノクローナル抗体固相化プレート」に4. で調製した混合液を 100 μ L/well ずつ分注し、液面が水平になるように端を軽くたたきます。

「⑩プレートシール」を表面に貼り、室温(18~25°C)で 60 分間反応させます。

※マイクロプレートは、必要なwell数だけ使用することができるよう、8well ずつのスプリットタイプになっています。未使用部分は乾かす際とともにチャック付ラミネート袋に戻し、密封後、冷蔵保存しておけば次回も使用することができます。

※測定誤差の原因となりますので、分注する際泡が入らないように注意してください。
※異物混入および蒸発防止のため、反応中はプレートシールでマイクロプレート上面を覆ってください。
※反応中はマイクロプレートを静置してください。
※23℃の保持が可能な恒温槽を所有している場合は、恒温槽の使用をおすすめします。
※特に検体数が多い場合は、各検体の抗原抗体反応時間が一定になるように注意してください。

6. 「洗浄液」の調製

抗原抗体反応時間中に、「⑤ 6倍濃縮洗浄液」と蒸留水を 1:5 の割合で混合し、洗浄液を調製します(例：20mL の「⑤ 6倍濃縮洗浄液」に 100mL の「蒸留水」を添加)。

※分割使用の場合は、1 回の測定に必要な量だけ分取して使用してください。1well あたり約 1.2mL (1 プレートあたり約 120mL) を調製の目安としてください。

※一旦希釈した洗浄液は冷蔵保存し、希釈後 1 ヶ月以内に使用してください。

7. 未反応物の除去

プレートシールを取り、反応液を捨て、洗浄液 300 μ L/well を用いて well 内を 3 回洗浄します。3 回目の洗浄液を捨てた後は、裏返したマイクロプレートをペーパータオル等の上で軽くたたいて(タッピング)、洗浄液を完全に除去します。

※3 回目の洗浄液を捨てた状態で、次の「発色試薬」を調製すると効率的です。

※測定誤差の原因となりますので、3 回目の洗浄後は well の底に洗浄液が残っていないことを確認してください。

※プレート裏面の汚れは吸光度の測定誤差の原因となりますので、触れないように注意してください。

※反応液は回収し、APE を水系に直接棄棄しないでください(例：布や紙へ吸い取り、焼却処理)。

8. 「発色試薬」の調製

「⑥発色基質溶液」と「⑦発色基質希釈液(赤シール)」を 1:100 の割合で混合し、発色試薬を調製します(例：12mL の「⑦発色基質希釈液」に 120 μ L の「⑥発色基質溶液」をチップの先で混合しながら添加)。

※使用直前(15 分以内)に調製してください。

※発色基質希釈液を先に分注し、その後、発色基質溶液を混合してください。

※1 回の測定に必要な量だけ分取し、使用してください。8well あたり約 1mL (1 プレートあたり約 12mL) を調製の目安としてください。残りは速やかにフタを固く閉め、冷蔵保存してください。

※希釈後の発色試薬は保存使用できません。

9. 発色反応

8. で調製した発色試薬を 100 μ L/well 加え、プレートシールを再び表面に貼って、室温(18~25℃)で 30 分間反応させた後、「⑧発色停止液(黒キャップ)」を 100 μ L/well ずつ添加します。

※18~30℃の恒温槽を所有している場合は、一定温度での使用をおすすめします。

※特に検体数が多い場合は、各検体の発色反応時間が一定になるように注意してください。

※発色試薬を加えると青色に、発色停止液を加えると黄色に呈色します。

10. 比色および濃度計算

プレートリーダーを用い、波長 450nm で吸光度(OD)を測定します。

方眼紙もしくはパソコンを利用し、検液中の APE 濃度を算出します。検液中の APE 濃度より、次式を用いて試料中の APE 濃度を算出します。

$$\text{試料中の APE 濃度}(\mu\text{g/L}) = \text{検液中の APE 濃度}(\mu\text{g/L}) / 0.9 / \text{濃縮倍率}$$

(係数 0.9 は、添加した 10%(V/V)メタノール由来の補正係数)

※発色反応停止後 15 分以内に測定してください。

※標準曲線は測定ごとに作成してください。

※マイクロプレートの裏面には触れないよう注意してください。

※測定は定量範囲内 (0.02-1mg/L) とし、1mg/L を越える高濃度の試料は 10%メタノールで希釈した後、再測定してください。

■ APE 濃度算出方法 ■

方眼紙利用:

APE 0 $\mu\text{g/L}$ の時の OD を 100%として、各濃度での阻害率(B/B0%)を次式により算出します。

$$\text{阻害率 (B/B0\%)} = (\text{サンプルまたは標準液のOD}) / (\text{APE 0 } \mu\text{g/Lの時のOD})$$

標準液の APE 濃度($\mu\text{g/L}$)と OD または B/B0%を両対数方眼紙(または片対数方眼紙)にプロットして検量線を作成し、得られた検量線より検液中の APE 濃度を算出します。

(測定例)

Standard OD or B/B0%

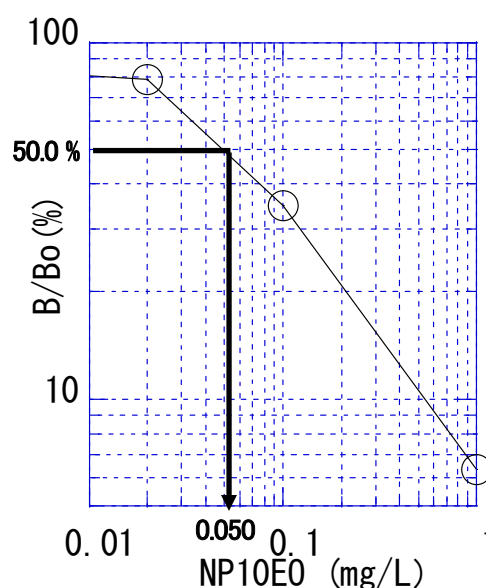
APE(mg/L)	OD	B/B0%
0	1.264	100
0.02	0.995	78.7
0.10	0.440	34.8
1.00	0.081	6.4

方眼紙からの読み取り例

APE (mg/L)	OD	B/B0%
0.050	(0.632)	50.0

Log-Log Graph Paper Calculation

APE=0.050(mg/L) from B/B0%=52.0%



パソコン利用:

データ処理ソフトウェアを用いて 4-parameter logistic fitting 後、回帰式より検液中の APE 濃度を算出します。

データ処理ソフトウェアの例

“デルタソフト” : BioMetallics, Inc., Princeton, NJ (<http://www.microplate.com>)

測定サンプル数（例）

添付の「抗 APE モノクローナル抗体固相化マイクロプレート」には 96 の well があります。

例1)一括測定： APE標準液として 4 系列(0, 0.02, 0.1, 1.0mg/L)を使用

APE 標準液として 4 系列を n=2 で使用すると、残りの well 数は 88 となりますので、44 サンプル(n=2)を一度に測定することができます。

【レイアウト例】検液は分割しやすいように縦方向に分注してください(A1～D2 は標準液に使用)。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	S5	S5	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37
B	0.02	0.02	S6	S6	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38
C	0.1	0.1	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S31	S39	S39
D	1.0	1.0	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40
E	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S25	S25	S33	S33	S41	S41
F	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34	S42	S42
G	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35	S43	S43
H	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36	S44	S44

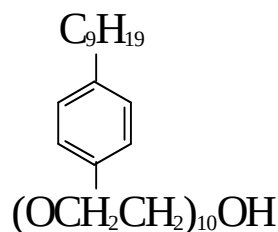
例 2)二分割測定： APE標準液として 4 系列を使用 (n=2)

一回当たりの検体数が 20 以下の場合、二分割での測定が可能です (n=2)。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	S5	S5	S13	S13	0	0	S5	S5	S13	S13
B	0.02	0.02	S6	S6	S14	S14	0.02	0.02	S6	S6	S14	S14
C	0.1	0.1	S7	S7	S15	S15	0.1	0.1	S7	S7	S15	S15
D	1.0	1.0	S8	S8	S16	S16	1.0	1.0	S8	S8	S16	S16
E	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S1	S1	S9	S9	S17	S17
F	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S2	S2	S10	S10	S18	S18
G	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S3	S3	S11	S11	S19	S19
H	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S4	S4	S12	S12	S20	S20

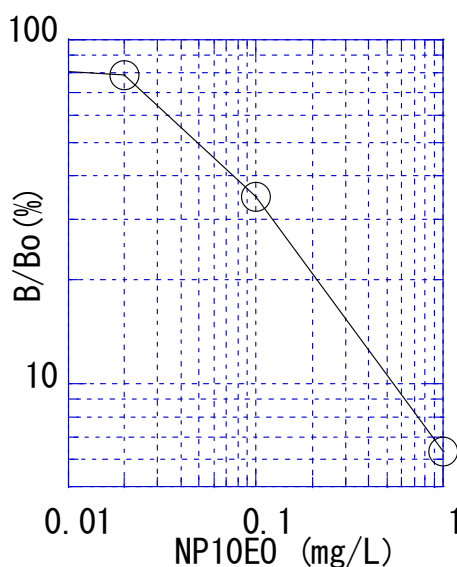
APE の構造と抗体の交差反応性

標準品: ノニルフェノールエトキシレート(平均酸化エチレン鎖数 10)



化合物	交差反応性(%)
非イオン界面活性剤	
ノニルフェノールエトキシレート(NPE)	
酸化エチレン鎖数(平均) 20 (NP20EO)	79
" 15 (NP15EO)	73
" 10 (NP10EO)	100
" 5 (NP5EO)	82
酸化エチレン鎖数(単一) 2 (NP2EO)	32
" 1 (NP1EO)	14
オクチルフェノールエトキシレート(OPE)	
酸化エチレン鎖数(平均) 20 (OP20EO)	92
" 15 (OP15EO)	129
" 10 (OP10EO)	200
" 5 (OP5EO)	244
酸化エチレン鎖数(単一) 2 (OP2EO)	129
ノニルフェノールポリエトキシ酢酸(NPEC)	
酸化エチレン鎖数(単一) 2 (NP2EC)	267
" 1 (NP1EC)	200
アルキルエトキシレート (AE)	<0.2
陰イオン界面活性剤	
直鎖アルキルベンゼンスルホン酸 (LAS)	<0.2
ラウリン酸ナトリウム	<0.2
ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)	<0.2
アルキル硫酸エステル (AES)	<0.2
構造類似物質	
フェノール	<0.2
ポリエチレングリコール (PEG)	<0.2

標準曲線 (例)



定量範囲は 20～1000 $\mu\text{g/L}$ (0.02～1mg/L) と高感度で、定量範囲内濃度の試料はろ過だけで測定することができます。定量下限値以下の試料は、固相抽出による濃縮を併用することで測定可能です。測定値の CV (変動係数) は 10% 以下で、ばらつきが少なく、高精度です。

参考文献

- 1) 日本界面活性剤工業会 (2002) 平成 13 年界面活性剤等統計年報
- 2) 環境省:平成 13 年度第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会 (2002.8)
- 3) 環境省:平成 14 年度第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会 (2003.6)
- 4) R. Rener, Env. Sci.Technol., **31** (7), pp.316-320 (1997)
- 5) デンマーク環境省プレスリリース (Environment Daily, 2003/03/19)
- 6) 水質基準に関する省令の規定に基づき厚生労働大臣が定める方法(平成15年7月22日厚生労働省告示第261号、別表第28)
- 7) 相澤ら (1998) 水道における非イオン界面活性剤の問題、第 1 回日本水環境学会シンポジウム講演集、pp. 5-6
- 8) 郷田泰弘ら:用水と廃水、40 (9) pp.7-12 (1998)
- 9) 小林綾子ら:「界面活性剤用 ELISA の開発」第 52 回全国水道研究発表会講演集,578-579(2001)

Memo

・本キットは研究用試薬であり、疾病の診断またはその補助として使用することはできません
・使用説明書は予告なく変更する場合があります。