

特定原材料測定試薬

** F A テ ス ト E I A ー 甲 殻 類 II

—— 開発の経緯および特徴 ——

食品衛生法関連法規の改定により、平成14年4月から食物アレルギーを誘発する可能性が高い特定原材料5品目（卵、牛乳、小麦、そば、落花生）は、容器包装された加工食品および添加物への表示義務化され、平成20年6月からは「えび」および「かに」が特定原材料として表示が義務化されました。アレルギー物質を含む食品の表示を正しく行うためには、製造記録による確認と検査による特定原材料の混入の確認が必要です。

本試薬は、酵素免疫測定法（E I A : Enzyme Immuno Assay）を原理とした、原材料中あるいは加工食品中の甲殻類（えび類、かに類）由来タンパク質の測定試薬で、「アレルギー物質を含む食品の検査法について（参考）」（平成22年9月10日消費者庁食品表示課）に示されているF A テ ス ト E I A ー 甲 殻 類 「ニッスイ」の抽出用試薬および標準品を改良した新しいキットです。このキットは特許第5451854号を利用しています。

【特徴】

- 食品中の甲殻類（えび類、かに類）に由来するタンパク質を高感度に測定できます。
- 原材料から加工食品まで、加熱・加工等の有無によらず幅広い食品に適用できます。
- マウスモノクローナル抗体を用いているので特異性に優れています。
- 酵素免疫測定法のため、低濃度から高濃度まで正確に測定できます。

—— 全般的な注意 ——

- 本試薬は食品検査用試薬であり、それ以外の目的に使用しないでください。
- 添付文書を良く読み、記載された操作方法に従って使用してください。
- 測定結果に基づく特定原材料の有無については、原材料や製造記録の確認等、他の情報と併せて総合的に判断してください。

—— 形状・構造等（キットの構成） ——

- 抗体固相化プレート…………… 96 ウェル × 1 枚
- 標準品 (50 ng/mL) …………… 1.2 mL × 2 本
- 検体希釈液…………… 100 mL × 1 本
- 酵素標識抗体液…………… 13 mL × 1 本
- 酵素基質液…………… 13 mL × 1 本
- 反応停止液 (1N 硫酸) …………… 13 mL × 1 本
- 洗浄液 (10倍濃縮液) …………… 100 mL × 1 本

—— 使用目的 ——

食品中の甲殻類（えび類、かに類）に由来するタンパク質の測定

—— 測定原理 ——

プレートに固相化された抗甲殻類トロポミオシンモノクローナル抗体に試料中の甲殻類トロポミオシンが結合すると、固相抗体-甲殻類トロポミオシン複合体を形成します。二次反応で、酵素標識抗甲殻類トロポミオシンポリクローナル抗体を加えると、固相抗体-甲殻類トロポミオシン-酵素標識抗体複合体を形成します。この複合体の量は、試料中の甲殻類トロポミオシンの量に比例しますので、酵素標識抗体を酵素基質で発色させて、吸光度を測定することにより試料中の甲殻類トロポミオシン量を測定できます。甲殻類トロポミオシンに基づく試料中のえび・かに総タンパク質濃度は、既知濃度の標準品を用いて作成した標準曲線から求められます。

—— 操作上の注意 ——

- 測定試料の性質、採取法
 - 試料には加工食品あるいは食品原材料を使用してください。
 - 試料は食品一包装単位に含まれる可食部全体から調製してください。
 - 試料中の特定原材料の成分は不均一に分布すると考えられますので、必ず均質化操作を行ってください。
 - 均質化に使用する粉砕機（フードカッターなど）は試料毎に交換し、確実に洗浄してください。
- 検体の調製場所と検査場所は区切られた空間で行ってください。
- ピペットおよび秤による秤量精度は測定精度に反映しますので、器具の選定とその操作には十分注意してください。また、分注、希釈操作毎にマイクロピペットのチップを交換してください。
- 試薬は全て室温（20～25℃）に戻してから使用してください。
- 開封し取り出した〔1〕抗体固相化プレート〕は、直ちにご使用ください。室内に長時間放置すると湿気により劣化することがあります。
- 測定は3重測定で行ってください。
- 検体と〔4. 標準溶液〕の測定は同時に行い、検量線の作成は測定毎に行ってください。
- 反応温度（20～25℃）および反応時間は正確に行ってください。
- 酵素反応は遮光下で行ってください。
- 正しい測定値を得るために、洗浄操作において、ウェル内に残った液は完全に除いてください。また、洗浄後は速やかに次の試薬を加えてください。

—— 用法・用量（操作方法） ——

【必要な器具および試薬類】

- マイクロピペット、メスシリンダーおよびビーカー
- ポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）および試験管
- 粉砕機（フードカッターなど）
- 振とう機
- 遠心分離機（3,000×g以上が可能なもの）
- マイクロプレートリーダー（波長450 nmおよび600～650 nmが測定可能なもの）

7) F A テ ス ト II 抽出用試薬

【試薬の調製】

1. 検体抽出液の調製

〔1. 検体抽出液〕の調製には、別売のF A テ ス ト II 抽出用試薬（コード：08627）をご使用ください。〔A：抽出用A液（10倍濃縮液）〕、〔B：抽出用B液（10倍濃縮液）〕、〔C：抽出用C液（10倍濃縮液）〕および精製水を1：1：1：7の比率で混合し、必要量を調製してください。調製された〔1. 検体抽出液〕は、検体の抽出および〔3. 標準品希釈液〕の調製に使用します。〔A：抽出用A液（10倍濃縮液）〕に沈殿が生じている場合は、加温溶解してからご使用ください。

（調製例：24 検体測定する場合）

A：抽出用A液（10倍濃縮液）……………	50 mL
B：抽出用B液（10倍濃縮液）……………	50 mL
C：抽出用C液（10倍濃縮液）……………	50 mL
精製水……………	350 mL
	500 mL

2. 測定試薬の調製

- 抗体固相化プレート
そのまま使用します。室温（20～25℃）に戻してから開封してください。
- 標準品（50 ng/mL）
〔4. 標準溶液〕の調製に使用します。使用前に室温（20～25℃）に戻してください。
- 検体希釈液
そのまま使用します。抽出した検体の希釈、および〔3. 標準品希釈液〕の調製に使用します。使用前に室温（20～25℃）に戻してください。
- 酵素標識抗体液
そのまま使用します。使用前に室温（20～25℃）に戻してください。
- 酵素基質液
そのまま使用します。使用前に室温（20～25℃）に戻してください。
- 反応停止液 (1N 硫酸)
そのまま使用します。使用前に室温（20～25℃）に戻してください。
- 洗浄液 (10倍濃縮液)
精製水で10倍に希釈してください。洗浄には希釈した〔2. 洗浄液〕を使用してください。

〔7〕洗浄液（10倍濃縮液）……………	100 mL
精製水……………	900 mL
	1000 mL

3. 標準品希釈液の調製

上記の〔1. 検体抽出液〕の調製に従い調製した〔1. 検体抽出液〕を〔3〕検体希釈液〕で20倍に希釈し、必要量を調製してください。調製された〔3. 標準品希釈液〕は、〔4. 標準溶液〕の調製および測定溶液の再希釈に使用します。

（調製例：8濃度、3重測定の検量線の場合）

〔1. 検体抽出液〕……………	1 mL
〔3〕検体希釈液〕……………	19 mL
	20 mL

4. 標準溶液の調製

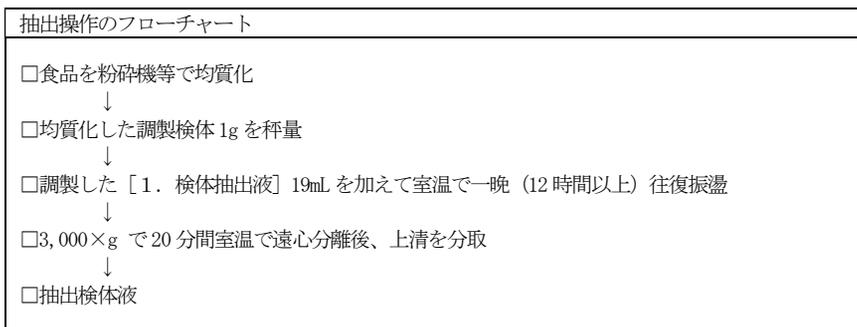
〔4. 標準溶液〕（0、0.78、1.56、3.13、6.25、12.5、25、50 ng/mL）を調製します。〔2〕標準品（50 ng/mL）を上記で調製した〔3. 標準品希釈液〕を用いて希釈し、必要量を調製してください。ブランクは調製した〔3. 標準品希釈液〕をそのまま使用します。（単位：μL）

濃度 (ng/mL)	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0
2) 標準品 (50ng/mL)	500	500	500	500	500	500	500	
3. 標準品希釈液		500	500	500	500	500	500	500

【操作方法】

1. 検体の調製・抽出操作

- 試料を粉砕機（フードカッターなど）で粉砕し、均質混和して調製検体とします。
- 均質化した調製検体 1 g をポリプロピレン製遠沈管（50 mL 容）に量り採り、調製した〔1. 検体抽出液〕19 mL を加え、よく振り混ぜて混合し、固形分を均等に分散させます。この際、あまり泡立たせないよう注意しながら、ボルテックス等を用いて検体を分散させます。
- 振とう機に遠沈管を横にして置き、室温で一晩（12 時間以上）振とうしながら抽出します。振とう回数は1分間に90 から110 往復程度、振とう幅は3 cm 程度として、振とうにより液が遠沈管の両端に打ち付けるようになるくらいに調整してください。
- 時々遠沈管の上下を入れ替えるなどの操作をして、液面に沿って付着する調製検体を分散させます。
- 抽出液のpHを確認し、必要であれば適切に薄めた水酸化ナトリウム溶液または希塩酸で中性付近（pH 6.0～8.0）になるよう調整します。
- 室温、3,000×g の条件で20 分間遠心し、遠心後に得られる上清を分取します。沈渣が得られない場合は上清を濾紙で濾過し、これを抽出検体液とします。

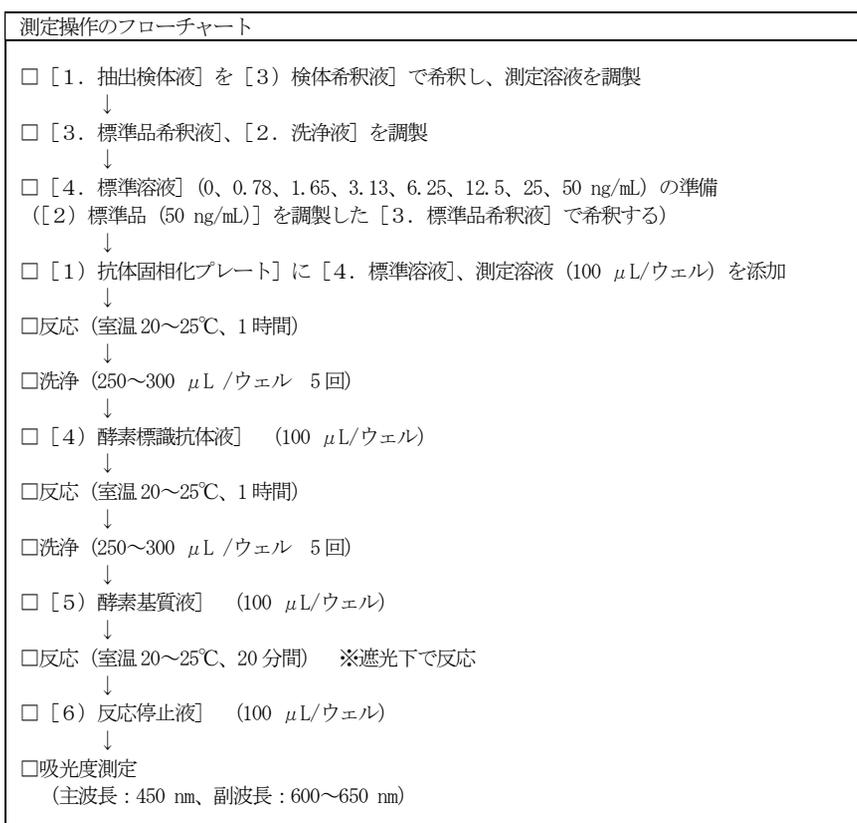


2. 測定溶液の調製操作

- 1) 上記において得た抽出検体液を、試験管内で [3] 検体希釈液 を用いて 20 倍希釈し、測定溶液とします。
- 2) 更に希釈して測定する場合には、調製した [3. 標準品希釈液] を用いて希釈してください。

3. 測定操作

- 1) [1] 抗体固相化プレート] の各ウェルに [4. 標準溶液]、測定溶液を 100 μ L ずつ添加します。
- 2) フタをして室温 (20~25°C) で 1 時間反応させます。
- 3) ウェル内の溶液を捨てた後、各ウェルに調製した [2. 洗浄液] を 250~300 μ L 添加し、捨てます。この操作を 5 回繰り返してください。
- 4) [4] 酵素標識抗体液] を各ウェルに 100 μ L ずつ添加します。
- 5) フタをして室温 (20~25°C) で 1 時間反応させます。
- 6) ウェル内の溶液を捨てた後、各ウェルに調製した [2. 洗浄液] を 250~300 μ L 添加し、捨てます。この操作を 5 回繰り返してください。
- 7) [5] 酵素基質液] を各ウェルに 100 μ L ずつ添加します。
- 8) フタをして室温 (20~25°C)、遮光下で 20 分間反応させます。
- 9) [6] 反応停止液] を各ウェルに 100 μ L ずつ添加します。
- 10) プレートリーダーで主波長 450 nm、副波長 600~650 nm の吸光度を測定してください。測定は反応停止後 30 分以内に行ってください。



測定結果の判定法

[データ解析方法]

- 1) 各ウェルの吸光度の平均値を算出します。
- 2) [4. 標準溶液] を測定して得られた吸光度から 4-パラメーター解析を用いて標準曲線を作成します。
- 3) 標準曲線より測定溶液の濃度 (ng/mL) を読み取ります。
- 4) 測定溶液の濃度に希釈倍率 (400 倍) を乗じて、試料中のえび・かに総タンパク質濃度 ppm (μ g/g) を算出します。

$$\text{試料中のえび・かに総タンパク質濃度 ppm} = \frac{\text{測定溶液の濃度 (ng/mL)} \times \text{抽出時の希釈倍数 (20 倍)} \times \text{測定時の希釈倍数 (20 倍)}}{1,000}$$

**/* 製造販売元

島津ダイアグノスティクス株式会社

東京都台東区上野 3-24-6 〒110-0005 TEL 03(5846)5611 (代)

[判定上の注意]

- 1) 本試薬は、日本標準商品分類における「7133 えび類 (いせえび・ざりがに類を除く。)、7134 いせえび・うちわえび・ざりがに (ロブスター等) 類」、「7135 かに類」の他に、「7136 その他の甲殻類」に反応性を示します。
- 2) 本試薬の測定範囲は、0.78~50 ng/mL (試料中のえび・かに総タンパク質濃度で 0.31~20 ppm) です。
- 3) 試料の加工による特定原材料等の成分の変化・分解などの理由により、抽出効率の変動、測定結果の変動が生じる場合があります。

—— 同等性評価結果 ——

消費者庁次長通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」(平成 22 年 9 月 10 日消費表第 286 号当職通知、および平成 26 年 3 月 26 日消費表第 36 号当職通知により一部改正) における「アレルギー物質を含む食品の検査方法の改良法の評価に関するガイドライン」を満たしていることを確認しました。

—— 使用上または取扱い上の注意 ——

1. 取扱い上の注意事項

- 1) 試薬をこぼした場合には、水で希釈してから拭き取ってください。なお、拭き取る際には、ゴム製の手袋等により手を保護してください。
- 2) 試薬が目や口に入った場合には、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師などに相談し、指示を受けてください。
- 3) 試薬が誤って皮膚および粘膜に付着した場合には、直ちに水で洗い流してください。
- 4) [6] 反応停止液] は、1N硫酸を使用しております。取り扱いの際には十分注意してください。

2. 使用上の注意事項

- 1) 本試薬は凍結を避け、貯法に従い保存してください。それ以外の条件に保存した試薬は、品質が変化して正しい結果が得られないことがありますので使用しないでください。
- 2) 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- 3) ロットの異なる試薬を組み合わせ使用しないでください。
- 4) 保存中や反応中は強い光にさらさないでください。
- 5) [1. 検体抽出液] には界面活性剤と還元剤を含んでおりますので、検査中はマスクや使い捨てのプラスチック製手袋等の着用をお勧めします。
- 6) 頭胸部を含む生のえび、かに (非加熱の乾燥品を含む) を測定試料とする場合、酵素の影響によって抽出中にトロボミオンが分解し、測定値が低下する可能性があります。これらを測定試料とする場合には、弊社コスモ会ホームページに情報を公開しておりますので参考にしてください。

3. 廃棄上の注意事項

- 1) 使用後の試薬は、十分の水で流して廃棄してください。
- 2) 使用後の試薬容器および使用した器具等の廃棄の際には、廃棄物に関する規定に従って適切に処理してください。

—— 貯蔵方法・有効期間 ——

[貯蔵方法]

冷所 (2 ~ 8°C) で遮光して保存してください。

[有効期間]

製造後12ヶ月間。外箱および容器のラベルに使用期限を表示してあります。

** —— 包装単位 ——

FAテスト E I A-甲殻類II Code 08624

—— 別売関連製品 ——

FAテストII 抽出用試薬 Code 08627

—— 主要文献 ——

- 1) 厚生労働省「アレルギー物質を含む食品の検査方法について(一部改正)」: 食安発第0622003号
- 2) 消費者庁「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」: 消費表第286号
- 3) 消費者庁「アレルギー物質を含む食品の検査方法について(一部改正)」: 消費表第36号
- 4) 柴原裕亮、岡道弘、他: サンドイッチELISA法による食品中の甲殻類アレルゲンの検出、日本食品科学工学会誌、54(6)、280~286、2007
- 5) Sakai S. *et al.*: Interlaboratory Evaluation of Two Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits for the Determination of Crustacean Protein in Processed Foods. J. AOAC Int.、91(1)、123~129、2008
- 6) 柴原裕亮、山田一多、上坂良彦、他: 頭胸部を含む非加熱甲殻類のELISA検知法に適した抽出方法の開発、食品衛生学雑誌、50(4)、153~159、2009

**/* —— 問い合わせ先 ——

〒110-0005 東京都台東区上野 3-24-6
 島津ダイアグノスティクス株式会社 カスタマーサポート担当
 電話 03(5846)5707