



FASTKIT™ Immunochromato WHEAT <Instruction Manual>

※ Please read this instruction before use.

Background

Amendments to Food Sanitation Law in Japan have rendered it mandatory to label 5 specific raw food materials, (Eggs, Milk, Wheat, Buckwheat and Peanuts), identified to have a high possibility of triggering food allergies, as of April 2002. Verification of the Manufacturer's Data Report and verification of contamination of specified ingredients by testing is critical in order to carry out labeling correctly.

The FASTKIT IMMNOCHOMATO is a detection kit for wheat proteins in food using immunochromatography, with simple operation and results obtainable in a short period of time.

[Characteristics]

- 1) The FASTKIT Immunochromato can simultaneously identify the presence of multiple wheat proteins.
- 2) The FASTKIT Immunochromato is widely applicable to samples ranging from raw ingredients to processed foods.
- 3) One step simple operation; no background expertise necessary.
- 4) Results can be quickly obtained (15 mins).

Components of the Kit

| | | |
|---|-------|-----------------|
| A : Test plate | | 20tests |
| B : Dilution buffer | | .50mL× 1 bottle |
| C : Extraction/concentration buffer (×10 concentrate) | | 100mL× 1 bottle |

Purpose and Performance of the Kit

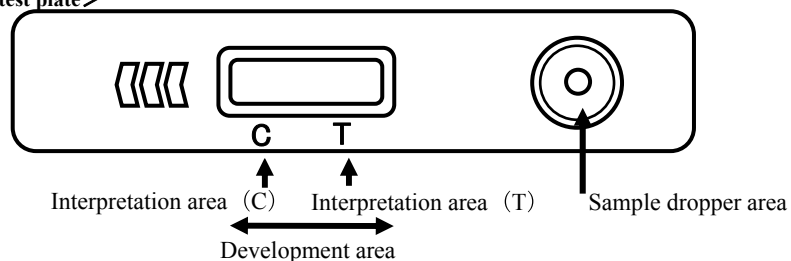
- Detection of wheat proteins contained in food samples.
- The Minimum detection sensitivity is several ppm, expressed as concentration in food (calculated from measured values that have been obtained using "FASTKIT Elisa WHEAT").*

Screening Principles

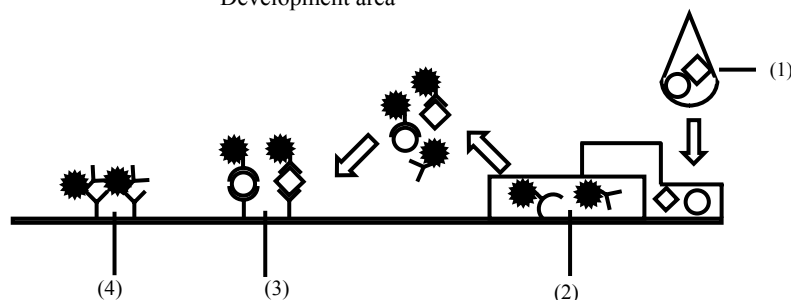
When the sample solution is dropped onto the sample dropper area of the test plate, colloidal gold labeled rabbit anti-wheat antibodies (labeled (2) in diagram) are dissolved, creating a complex with the wheat proteins (labeled (1) in diagram) contained in the sample solution. These complexes move to the development area by capillary action, and are trapped by the anti-wheat antibodies (labeled (3) in diagram) fixed at interpretation area (T), with the colloidal gold creating a red-purple colored line at interpretation area (T). Interpretation in this Kit is carried out by observation, which interprets the presence of wheat proteins contained in the sample solution.

On the other hand, regardless of the presence of wheat proteins contained in the sample, the excess colloidal gold labeled antibodies move to the development area and are trapped by the anti-rabbit immunoglobulin antibodies (labeled (4) in diagram) fixed at interpretation area (C), with the colloidal gold creating a red-purple colored line at interpretation area (T). Normal movement of the sample solution to the development area is verified by a red-purple colored line at interpretation area (C).

<Separate parts of the test plate>



<Principle diagram>



Procedure 1 (Preparation of Reagents)

[Equipment]

- A homogenizer (a food cutter, a grinder or a mill)
- A centrifuge (one which can be operated at higher than 3,000 x g and 4°C is preferable), centrifuge tubes, filter paper, funnels, graduated cylinders and beakers
- Micropipettes (those which can dispense 10 to 1000-μL of liquid are preferable)

[Preparation of Reagents]

- 1) Return dilution buffer and extraction/concentration buffer to room temperature before use.
- 2) Dilute extraction/concentration buffer × 10 with purified water before use.

Note 1) When sedimentation has occurred in the extraction/concentration buffer, return to room temperature and dissolve sedimentation before diluting with purified water.

Note 2) The dilution buffer and extraction/concentration buffer can be used irrespective of the type of Kit as they are of identical composition throughout the FASTKIT Immunochromato Series.

[An example of sample-extract preparation]

Conditions for the optimal extraction of wheat proteins may differ depending on the food sample, therefore it is necessary to analyze the composition of each sample.

Following is a general example of an extraction procedure.

- 1) Each of the food samples should be ground into a homogenous state or paste.
- 2) Each 2-g sample should be homogenized with 38 mL of the diluted extraction buffer for 30 sec. This procedure should be repeated three times for each sample.
- 3) The homogenate should be centrifuged for 20 min at higher than 3,000 x g and 4°C.
- 4) The supernatant should be filtered through filter paper.
- 5) The filtrate should be diluted 10 parts to 1 with the dilution buffer to provide a sample extract.

Note 1) It is absolutely necessary to prevent the wheat components from being contaminated throughout the process. Therefore, equipment such as the homogenizer should be washed after each procedure. (Wash the equipment with a neutral detergent and then soak them in an alkaline detergent overnight, or wash them in an ultrasonic washer for 30 min.)

Note 2) The sample extracts should be adjusted to neutral pH (6.0 to 8.0). As it is difficult to extract the wheat proteins from certain foods, the samples should be well processed and the extraction process carried out with great care.

Note 3) As the presence of insoluble substances such as fat are the cause of non-specific reactions it may be necessary to alter the centrifuging variables. (e.g. centrifuge for 30 min at 4°C at higher than 10,000 x g)

Note 4) Store the sample extracts at 4°C and subject them to analysis as soon as possible. Avoid freezing.

<Procedure of sample extraction>

Sample

| ←Grind into a homogeneous state

2 g of the sample

| ←Add 38 mL of extraction buffer and homogenize

Sample Extract

| ←Centrifuge for 20 min at 3,000 x g and 4°C

Supernatant

| ←Filter through filter paper

Filtrate

| ←Dilute 10 parts to 1 with the dilution buffer

Extract for analysis

Procedure 2 (IMMUNOCHROMATO Procedure)

Warning: Correct results can become unobtainable due to the effect of moisture absorption on the immunochromatography test plate, therefore, only remove from the aluminum pouch immediately before use and only after returning it to room temperature.

[Preparation of Reagents]

Return the test plate to room temperature while still inside the aluminum pouch, then remove from the aluminum pouch directly before use. Make sure not to touch the test plate's sample dropper or the interpretation area with your finger etc.

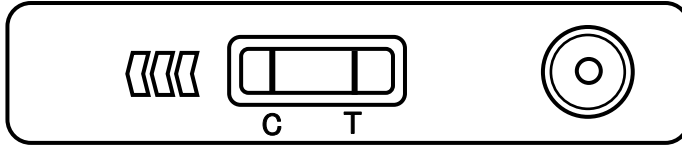
After sufficiently mixing the sample solution prepared in accordance with operation method 1 (preparation of sample solution), drop 100μL on the test plate's sample dropper area using a micropipette, and leave sitting on a level surface for 15 minutes and make a visual interpretation.

Note 1) The micropipette tip must be replaced after each test.

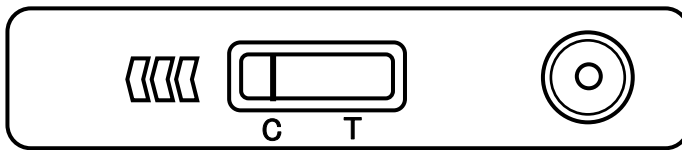
[Interpretation of results]

Warning: The interpretation result is obtained 15 minutes after the commencement of the test. Also, irrespective of the shade, test are interpreted as positive when the red-purple colored line is observed.

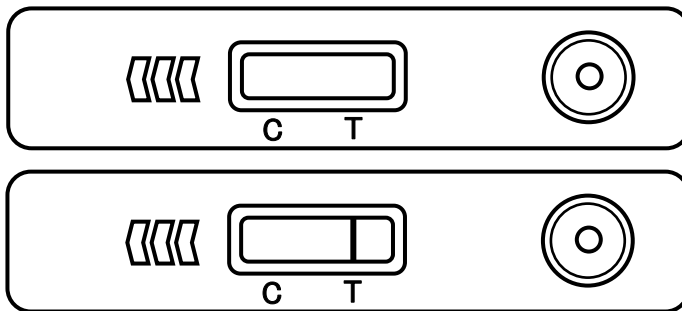
Positive: Positive test results are indicated by a red-purple line at interpretation area (T) and interpretation area (C). A weak positive test result is designated as + w, positive as +, and a strong positive as ++.



Negative: A negative test result is indicated by a red-purple line at interpretation area (C).



Interpretation deferral (re-test): When no red-purple colored line is observed in both interpretation area (T) and interpretation area (C), or when the red-purple colored line is only observed in interpretation area (T), then subject to a retest.



False Positive (Cross-Reaction or Non-Specific Reaction) and False Negative Reactions

- 1) With the exception of the wheat, cross-reaction occurs with the buckwheat. No cross-reaction occurs with the other specific ingredients, (eggs, cow milk and peanuts).
- 2) Cross-reactions may occur with the protein of barley, rye, oats, chestnuts, black pepper, coriander, mustard seed, horseradish, curry powder, cinnamon, tiger bean (*Phaseolus vulgaris L. cv Toramame*) and tochu tea (*Eucommia ulmoides*), resulting in false-positive results*.
- 3) Nonspecific reactions may occur, in the presence of highly viscous foods* and extremely concentrated proteins. In such cases, carry out analysis with optimum concentrations of dilutions.
- 4) The following foods may yield false-negative results: foods meat products sterilized by high-temperature and high-pressure treatment, canned whale products, retort-pouched foods, and baked foods
- 5)

Correlation between FASTKIT ELISA and FASTKIT Immunochromato*

| Overall agreement ratio 225/241specimens (93.4%) | | FASTKIT ELISA wheat | | | | Total |
|--|----------|---------------------|---------|--------|----------|--------------|
| | | More than 10ppm | 5~10ppm | 1~5ppm | Negative | |
| FASTKIT Immunochromato Wheat | Positive | 61 | 5 | 8 | 2 | 76 |
| | Negative | 0 | 0 | 14 | 151 | 165 |
| Total | | 61 | 5 | 22 | 153 | 241specimens |

- 1) Specimens indicating 1ppm or greater using FASTKIT ELISA Wheat are positive.
- 2) Detection sensitivity depends on the components of food.

Precautions for the Use

[General Warnings]

- 1) Read the instruction leaflet carefully. Use the kit according to the procedures described in the instruction leaflet.
- 2) Do not use any kit that has passed its expiry date. The expiration date is printed on a label on the outer case and test plate's aluminum bag.
- 3) FASTKIT has been developed to measure the allergic substances in selected foods. Therefore, it is not a diagnostic reagent for food allergies. There has been no proven correlation between the test results of this kit and the allergy development and or symptoms.
- 4) Do not determine the presence or absence of allergic substances according not only to the results of the FASTKIT but also on other information obtained by reviewing the records of the raw ingredients, manufacturing processes and so on.
- 5) This instruction is prepared as a guideline for inspection personnel. It is the responsibility of the user to determine the usefulness of the kit and or the suitability to each of the selected foods.
- 6) Kit specifications may be altered without prior notice.

[Safety Precautions]

- 1) Do not smear any reagent from the kit on your skin, mucosa, clothing, etc.
- 2) If any of the reagents are swallowed or come into contact with the eyes, rinse thoroughly with tap water and seek medical attention.

Storage and Expiration Date

[Storage]

The kits should be stored in a refrigerator (2 to 8°C) in the absence of light. Avoid freezing.

[Expiration Date]

Valid for 12 months from the production date in an unopened aluminum bag. The expiration date is printed on the outer case and test plate's aluminum bag.

[References]

- 1) Ministry of Health, Labour and Welfare, "Test Methods of Food Containing Allergy Substances" (SHOKUHATSU No. 1106001)
- 2) Eiji Marui: Shokuhin Eisei Kenkyu (Food Sanitation Research) Vol.52 (5), p25-31, 2002
- 3) Hiroshi Akiyama, Masatake Toyoda: Shokuhin Eisei Kenkyu (Food Sanitation Research) Vol.52 (6), p65-73, 2002

※ The FASTKIT Immunochromato Series applies the basic technology of immunochromatograph held by Becton Dickinson and Company, Ltd. and is made with the antibodies utilized in Nippon Meat Packers, Inc.**

[Distribution Source and Contact] **

Indicate side surface of outer case

[Manufacturer] **

Research and Development Center
Nippon Meat Packers, Inc.
3-3 Midorigahara, Tsukuba, Ibaraki, 300-2646, Japan
Phone : +81-29-847-7825, Fax : +81-29-847-7824
URL : <http://www.rdc.nipponham.co.jp>

E2-C410520C71



COSMO BIO Co., LTD.
Inspiration for Life Science

TOYO EKIMAE BLDG, 2-20, TOYO 2CHOME, KOTO-KU, TOKYO 135-0016, JAPAN
TEL: +81-3-5632-9617 FAX: +81-3-5632-9618 e-mail: export@cosmobio.co.jp

www.cosmobio.co.jp

平成 15 年 10 月 20 日作成

「FASTKIT イムノクロマトシリーズ」リーフレット

日本ハム株式会社
中央研究所

検出感度

試験方法： 日本ハム(株)中央研究所にて保管している陽性管理検体 および陰性管理検体を用いて、抗原濃度 100ng/mL、25ng/mL、および 0ng/mL(牛乳キットでは 200ng/mL、50ng/mL、および 0ng/mL)での「FASTKIT イムノクロマトシリーズ」の反応性を確認しました。

試験結果：

| 抗原濃度 | FASTKIT イムノクロマト卵 | | FASTKIT イムノクロマト牛乳 | | FASTKIT イムノクロマト小麦 | | FASTKIT イムノクロマトそば | | FASTKIT イムノクロマト落花生 | |
|------------------------|------------------|-----|-------------------|-----|-------------------|-----|-------------------|-----|--------------------|-----|
| | 1回目 | 2回目 | 1回目 | 2回目 | 1回目 | 2回目 | 1回目 | 2回目 | 1回目 | 2回目 |
| 100ng/mL (200ng/mL) | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 25ng/mL (50ng/mL) | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 0ng/mL | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

1：()で示した抗原濃度は、「FASTKIT イムノクロマト牛乳」における試験濃度を示しています。

2：抗原濃度 25ng/mL(牛乳キットでは抗原濃度 50ng/mL)は、取扱説明書中の検体溶液調製列に従い前処理を行った場合(200倍希釈)の食品換算濃度 5ppm に相当します。

同時再現性

試験方法: 日本ノム(株)中央研究所にて保管している陽性管理検体 および陰性管理検体を用いて、抗原濃度 25ng/mL および 0ng/mL(牛乳キットでは 50ng/mL および 0ng/mL)を 5 回同時判定を行い、その同時再現性について確認を行いました。

試験結果:

| | FASTKIT ノム/クロスト卵 | | FASTKIT ノム/クロスト牛乳 | | FASTKIT ノム/クロスト小麦 | | FASTKIT ノム/クロストそば | | FASTKIT ノム/クロスト落花生 | |
|------|------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|--------------------|--------|
| | 25ng/mL | 0ng/mL | 50ng/mL | 0ng/mL | 25ng/mL | 0ng/mL | 25ng/mL | 0ng/mL | 25ng/mL | 0ng/mL |
| 1 回目 | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - |
| 2 回目 | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - |
| 3 回目 | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - |
| 4 回目 | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - |
| 5 回目 | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - |

フロゾン現象

試験方法: 取扱説明書中の検体溶液調製例に従い、特定原材料(卵、乳、小麦、そば、落花生)から抽出した検体溶液を用いて、「FASTKIT イムノクロマトシリーズ」のフロゾン現象の有無について確認を行いました。なお、検体溶液のタンパク質濃度についてはBCA法にて測定しました。

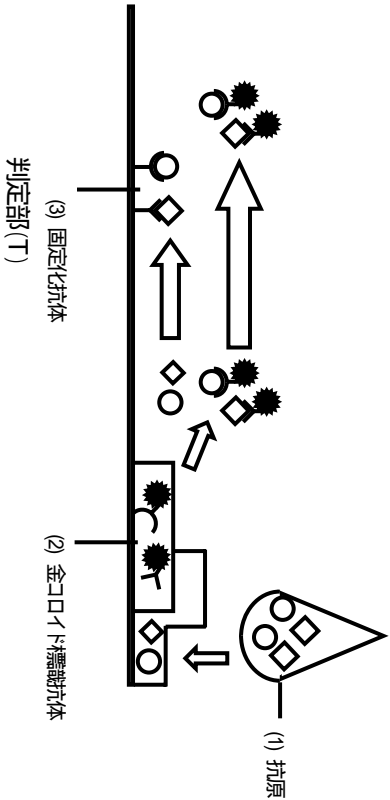
試験結果:

| FASTKIT イムノクロマト | | FASTKIT イムノクロマト | | FASTKIT イムノクロマト | | FASTKIT イムノクロマト | | FASTKIT イムノクロマト | | | |
|-------------------------------------|------|-------------------------------------|------|-------------------------------------|------|-------------------------------------|------|-------------------------------------|------|-------------------------------------|------|
| 生卵 | | 全卵乾燥粉末 | | 牛乳 | | 小麦粉 | | そば粉 | | 脱脂落花生 | |
| 抗原濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 試験結果 | 抗原濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 試験結果 | 抗原濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 試験結果 | 抗原濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 試験結果 | 抗原濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 試験結果 | 抗原濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 試験結果 |
| 10 | +++ | 10 | +++ | 10 | +++ | 10 | ++++ | 10 | ++++ | 10 | ++++ |
| 100 | +++ | 100 | ++ | 100 | ++ | 100 | +++ | 100 | +++ | 100 | +++ |
| 370 | +++ | 1,930 | ++ | 1,340 | ++ | 137 | ++ | 243 | +++ | 983 | ++ |
| 740 | +++ | 3,860 | ++ | 2,680 | ++ | 274 | ++ | 486 | ++ | 1,970 | + |
| 1,480 | +++ | 7,720 | + | 5,360 | ++ | 548 | ++ | 972 | ++ | 3,930 | + |
| 3,700 | ++ | 19,300 | ++ | 13,400 | + | 1,370 | + | 2,430 | + | 9,830 | + |

1: 判定部の赤紫色のラインの濃さを「+」の数で示しました。「+」の数が多いほどラインが濃いことを示しています。

<フロゾン現象について>

フロゾン現象とは、抗原量が過剰に存在するときに反応が陰性化する現象のことです。



通常のイムノクロマト法では、金コロイド標識抗体(2)と結合した検体溶液中の抗原(1)が、判定部上の固定化抗体(3)に補足されることにより、金コロイドが密集し、判定部に赤紫色のラインが生じます。フロゾン現象では(左図参照)、検体溶液中の抗原(1)が金コロイド標識抗体(2)より過剰に存在するため、金コロイド標識抗体と結合していない抗原が判定部上の固定化抗体(3)に補足されます。そのため、抗原と金コロイド標識抗体の複合体が判定部上の固定化抗体(3)に補足されにくくなり、判定部の赤紫色のラインが薄くなるまたは消失する場合があります。

本キットでは高濃度の抗原が存在する場合、赤紫色のラインが若干薄くなりましたが、消失することはありませんでした。本試験では特定原材料そのものを検体として試験を行っているため、これ以上の抗原を含む加工食品を試験する可能性は非常に低いと考えられます。従って、一般的な加工食品を取扱説明書に従い試験する限り、フロゾン現象により赤紫色のラインが消失することはありません。

偽陽性を示す食品1

試験方法： 取扱説明書中の検体溶液調製例に従い、特定原材料の類似(近縁)食品を中心とした食品検体から抽出した検体溶液を用いて、「FASTKIT エライザシリーズ」と「FASTKIT イムノクロマトシリーズ」にて試験を行い、偽陽性を示す食品の確認を行いました。

試験結果(卵、牛乳、小麦)：

| 卵 | | | 牛乳 | | | 小麦 | | |
|---------|-------------------|-----------------|--------|-------------------|-----------------|--------|-------------------|-----------------|
| 検体名 | エライザ 測定結果(ppm) | イムノクロマト 試験結果 | 検体名 | エライザ 測定結果(ppm) | イムノクロマト 試験結果 | 検体名 | エライザ 測定結果(ppm) | イムノクロマト 試験結果 |
| 牛乳 | <1.0 | - | 卵 | <1.0 | - | 卵 | <1.0 | - |
| 小麦 | <1.0 | - | 小麦 | <1.0 | - | 牛乳 | <1.0 | - |
| そば | <1.0 | - | そば | <1.0 | - | そば | <1.0 | +w |
| 落花生 | <1.0 | - | 落花生 | <1.0 | - | 落花生 | <1.0 | - |
| アヒル卵 | 6.9 | +w | ヤギ乳 | 20< | +w | 大麦 | 2.9 | + |
| ウズラ卵 | 18.2 | + | ヒツジ乳 | 20< | +w | ライ麦 | 20< | + |
| いくら | 1.0 | - | 牛肉(生) | 20< | ± | オオツ麦 | 12.0 | + |
| たらこ | 1.5 | - | 牛肉(加熱) | <1.0 | - | トウモロコシ | <1.0 | - |
| 牛肉(生) | <1.0 | - | 豚肉(生) | <1.0 | - | ナタネ | <1.0 | - |
| 牛肉(加熱) | <1.0 | - | 豚肉(加熱) | <1.0 | - | アヲ | <1.0 | - |
| 豚肉(生) | <1.0 | - | 鶏肉(生) | <1.0 | - | 小豆 | <1.0 | - |
| 豚肉(加熱) | <1.0 | - | 鶏肉(加熱) | <1.0 | - | 大豆 | <1.0 | - |
| 鶏肉(生) | 13.5 | + | 大豆 | <1.0 | - | 米 | <1.0 | - |
| 鶏肉(加熱) | <1.0 | - | 米 | <1.0 | - | ゴヤ | <1.0 | - |
| 大豆 | <1.0 | - | | | | ココア | <1.0 | - |
| 米 | <1.0 | - | | | | アーモンド | <1.0 | ± |
| 子持ちシシヤモ | <1.0 | ± | | | | | | |

1：アヒル卵、ウズラ卵は特定原材料の「卵」に含まれます。

2：「+」は陽性(判定者に関わらず濃いラインが確認できる)、「+w」は弱陽性(判定者に関わらず薄いラインが確認できる)、「±」は弱々陽性(判定者によっては極めて薄いラインを見逃す可能性がある)、「-」は陰性(判定者に関わらずラインが確認できない)を示しています。

試験結果(そば、落花生)：

| そば | | | 落花生 | | |
|----------|-------------------|-----------------|----------|-------------------|-----------------|
| 検体名 | エライザ 測定結果(ppm) | イムノクロマト 試験結果 | 検体名 | エライザ 測定結果(ppm) | イムノクロマト 試験結果 |
| 卵 | <10 | - | 卵 | <10 | - |
| 牛乳 | <10 | - | 牛乳 | <10 | - |
| 小麦 | <10 | - | 小麦 | <10 | - |
| 落花生 | <10 | - | そば | <10 | - |
| タニソバ | 52 | +w | アーモンド | 15 | +w |
| 藍 | <10 | - | カシューナッツ | 10 | ± |
| ソレル | <10 | - | ピスタチオ | <10 | - |
| イヌタデ | <10 | - | クルミ | <10 | - |
| ハルタデ | <10 | - | マカダミアナッツ | <10 | +w |
| イタドリ | <10 | - | ヘーゼルナッツ | 12 | ± |
| ミズヒキ | <10 | - | ゴマ | <10 | - |
| 小豆 | <10 | - | 小豆 | <10 | - |
| 大豆 | <10 | - | 大豆 | <10 | - |
| 米 | <10 | - | 米 | <10 | - |
| ナタネ | <10 | ± | トウモロコシ | <10 | - |
| トウモロコシ | <10 | - | ナタネ | <10 | - |
| アヲ | <10 | - | アヲ | <10 | - |
| マカダミアナッツ | 14.7 | +w | ココア | <10 | - |
| ココッパルガ- | <10 | +w | ココッパルガ- | <10 | ± |
| ゴマ | 12 | - | 枝豆 | 15 | + |
| | | | ソラマメ | <10 | - |
| | | | インゲン豆 | <10 | - |
| | | | さやえんどう | <10 | - |
| | | | レッドキドニー | <10 | - |
| | | | グリーンピース | <10 | - |
| | | | ささげ豆 | 1.4 | - |
| | | | 大正金時豆 | 1.9 | ± |

1:「+」は陽性(判定者に関わらず濃いラインが確認できる)、「+w」は弱陽性(判定者に関わらず薄いラインが確認できる)、「±」は弱々陽性(判定者によっては極めて薄いラインを見逃す可能性がある)、「-」は陰性(判定者に関わらずラインが確認できない)を示しています。

偽陽性を示す食品2

試験方法: 「FASTKIT イムノクロマト小麦」において、特定原材料であるそばに対して交差反応により偽陽性を示すことが確認されたため、偽陽性を示すそば抗原量を確認することを目的として、2種類のそば抽出液を希釈用緩衝液にて希釈し確認を行いました。

試験結果:

| 希釈倍率 | そば抽出液1 (38mg/mL) | | そば抽出液2 (2.43mg/mL) | |
|---------|------------------------------|------|------------------------------|------|
| | 抗原濃度 ($\mu\text{g/mL}$) | 試験結果 | 抗原濃度 ($\mu\text{g/mL}$) | 試験結果 |
| × 10 | 380 | + W | 243 | + W |
| × 100 | 38 | ± | 24.3 | ± |
| × 200 | 19 | - | 12.15 | - |
| × 400 | 9.5 | - | 6.075 | - |
| × 600 | 6.3 | - | 4.05 | - |
| × 800 | 4.8 | - | 3.038 | - |
| × 1,000 | 3.8 | - | 2.43 | - |

1: 「+ W」は弱陽性(判定者に関わらず薄くラインが確認できる)、「±」は弱々陽性(判定者によっては極めて薄くラインを見逃す可能性がある)、「-」は陰性(判定者に関わらずラインが確認できない)を示しています。

「FASTKIT イムノクロマト小麦」のそば抗原に対する反応性は、希釈用緩衝液により200倍希釈(そば抗原濃度20 $\mu\text{g/mL}$ 以下)することにより消失しました。従って、そば抗原に対する偽陽性を回避するためには、通常の希釈緩衝液による希釈倍率(測定時:10倍、合計:200倍)ではなく、20倍の希釈(合計:4,000倍)する必要があります。

そば粉への小麦粉の混入を検査する際に「FASTKIT イムノクロマト小麦」のそば抗原に対する偽陽性が問題となりますので、上記のとおり操作して頂くとともに、数値の取り扱いにご注意ください。そばの偽陽性がでない様に希釈した際の小麦粉の検出感度は、キットの検出限界が25ng/mLであることから500ng/mL以上(食品換算濃度で100ppm以上)となります。

「FASTKIT エライザシリーズとの相関性1」

試験方法： 食品および食品原材料を用いて、「FASTKIT イムノクロマトシリーズ」と「FASTKIT エライザシリーズ」の相関性を確認しました。試験はそれぞれの取扱説明書に従い実施しました。

試験結果 (相関性データ)：

| | FASTKIT エライザシリーズ | | | | 合計 | 一致率 |
|---------------------------|------------------|---------------------|--------------------|---------|-----|-------------------------|
| | 10ppm 以上 | 5ppm 以上 10ppm 未満 | 1ppm 以上 5ppm 未満 | 1ppm 未満 | | |
| FASTKIT イムノクロマト 卵 | 陽性 | 46 | 16 | 13 | 1 | 240 / 249 検体 (96.4%) |
| | 陰性 | 1 | 1 | 6 | 165 | |
| | 合計 | 47 | 17 | 19 | 166 | |
| FASTKIT イムノクロマト 牛乳 | 陽性 | 61 | 10 | 13 | 1 | 235 / 246 検体 (95.5%) |
| | 陰性 | 1 | 4 | 5 | 151 | |
| | 合計 | 62 | 14 | 18 | 152 | |
| FASTKIT イムノクロマト 小麦 | 陽性 | 61 | 5 | 8 | 2 | 225 / 241 検体 (93.4%) |
| | 陰性 | 0 | 0 | 14 | 151 | |
| | 合計 | 61 | 5 | 22 | 153 | |
| FASTKIT イムノクロマト そば | 陽性 | 10 | 2 | 2 | 4 | 241 / 249 検体 (96.8%) |
| | 陰性 | 1 | 1 | 2 | 227 | |
| | 合計 | 11 | 3 | 4 | 231 | |
| FASTKIT イムノクロマト 落花生 | 陽性 | 9 | 0 | 3 | 3 | 244 / 249 検体 (98.0%) |
| | 陰性 | 1 | 0 | 1 | 232 | |
| | 合計 | 10 | 0 | 4 | 235 | |

1：一致率はFASTKIT エライザシリーズで1ppm 以上を陽性として算出しました。

試験結果(卵キットにおける不一致検体)：

| 検体名 | 表示の有無 | | | | エライザ 測定結果(ppm) | イムノクロマト 試験結果 | 備考 |
|--------|-------|---|----|----|-------------------|-----------------|---------------------------|
| | 卵 | 乳 | 小麦 | そば | | | |
| ウンナー | × | | × | × | 1.4 | - | ELISA キット偽陽性(鶏肉) |
| 佃煮 | × | × | | × | 1.1 | - | ELISA キット偽陽性(海藻類) |
| ゼリー | × | × | × | × | 9.2 | - | ELISA キット偽陽性(増粘多糖類) |
| 紅茶 | × | × | × | × | 2.4 | - | ELISA キット偽陽性 |
| コーヒード | × | × | × | × | 1.0 | - | ELISA キット偽陽性 |
| 子持シヤモ | × | × | × | × | <1.0 | ± | イムノクロマトキット偽陽性 |
| タピオカ澱粉 | | × | × | × | 10< | - | 卵の混入確認済み。イムノクロマトキット検出限界未滿 |
| カゼイン | | | × | × | 1.6 | - | 卵の混入確認済み。イムノクロマトキット検出限界未滿 |
| 鶏肉炒め | | × | | × | 1.6 | - | イムノクロマトキット検出限界未滿 |

1：表示の有無における は表示有り、×は表示なし、は欄外表示もしくはは原材料の一部に含まれるを示しています。

2：「±」は弱々陽性(判定者によっては極めて薄いラインを見逃す可能性がある)、「-」は陰性(判定者に関わらずラインが確認できない)を示しています。

試験結果(牛乳キットにおける不一致検体)：

| 検体名 | 表示の有無 | | | | | エライザ 測定結果(ppm) | イムノクロマト 試験結果 | 備考 |
|---------|-------|----|----|----|-----|-------------------|-----------------|---------------------|
| | 卵 | 乳 | 小麦 | そば | 落花生 | | | |
| 牛肉(生) | × | × | × | × | × | 5.6 | - | ELISA キット偽陽性(牛肉) |
| ステーキ | × | × | × | × | × | 5.0 | - | ELISA キット偽陽性(牛肉) |
| 牛肉角切り | × | × | × | × | × | 5.7 | - | ELISA キット偽陽性(牛肉) |
| ゼリー | × | × | × | × | × | 17.5 | - | ELISA キット偽陽性(増粘多糖類) |
| コーゲン | × | × | × | × | × | 1.9 | - | ELISA キット偽陽性 |
| 豚肉から揚げ | | × | | × | × | 2.3 | - | ELISA キット偽陽性(?) |
| チゲ鍋 | × | × | | × | × | <1.0 | ± | イムノクロマトキット偽陽性(原因不明) |
| ミンタイチーズ | × | | | × | × | 2.8 | - | イムノクロマトキット検出限界未滿 |
| 揚げパン | 不明 | 不明 | 不明 | 不明 | 不明 | 1.1 | - | イムノクロマトキット検出限界未滿 |
| はんぺん | 不明 | 不明 | 不明 | 不明 | 不明 | 1.8 | - | イムノクロマトキット検出限界未滿 |
| 豚骨ラーメン | × | | | | × | 6.9 | - | 極めて薄いラインが認められた |

1：表示の有無における は表示有り、×は表示なし、は欄外表示もしくはは原材料の一部に含まれるを示しています。

2：「±」は弱々陽性(判定者によっては極めて薄いラインを見逃す可能性がある)、「-」は陰性(判定者に関わらずラインが確認できない)を示しています。

3：備考における(?)は製造ラインでの混入もしくはは原材料でのキャリアオーバーの可能性が否定できないことを示しています。

試験結果(小麦キットにおける不一致検体) :

| 検体名 | 表示の有無 | | | | | エライザ 測定結果(ppm) | イムノクロマト 試験結果 | 備考 |
|-----------|-------|---|----|----|-----|-------------------|-----------------|---------------------|
| | 卵 | 乳 | 小麦 | そば | 落花生 | | | |
| コーゲン | × | × | × | × | × | 1.7 | - | ELISA キット偽陽性 |
| 干しいたけ | × | × | × | × | × | 1.1 | - | ELISA キット偽陽性 |
| 削り節 | × | × | × | × | × | 1.5 | - | ELISA キット偽陽性 |
| 子持ソシヤモ | × | × | × | × | × | 1.7 | - | ELISA キット偽陽性 |
| 粉末ゼラチン | × | × | × | × | × | 3.5 | - | ELISA キット偽陽性 |
| ソーセージ | × | × | × | × | × | 1.9 | - | ELISA キット偽陽性(?) |
| 惣菜 | | | × | × | × | 2.3 | - | ELISA キット偽陽性(?) |
| サラミソーセージ | × | | × | × | × | 2.2 | - | ELISA キット偽陽性(?) |
| ハム | × | | × | × | × | 1.9 | - | ELISA キット偽陽性(?) |
| ライ麦(加熱処理) | × | × | × | × | × | 1.7 | - | ELISA キット偽陽性 |
| 鶏そぼろ | | × | | × | × | <1.0 | ± | イムノクロマトキット偽陽性(原因不明) |
| スーダ | × | × | | × | × | <1.0 | ± | イムノクロマトキット偽陽性(原因不明) |
| ウインナー | × | × | | × | × | 2.9 | - | イムノクロマトキット検出限界未満 |
| 粉末醤油 | × | × | | × | × | 1.7 | - | イムノクロマトキット検出限界未満 |
| 焼肉のタレ | × | × | | × | × | 1.5 | - | イムノクロマトキット検出限界未満 |
| トッピング | | × | | × | × | 2.8 | - | イムノクロマトキット検出限界未満 |

1:表示の有無における「」は表示有り、×は表示なし、「」は欄外表示もしくは原材料の一部に含まれるを示しています。

2:「±」は弱々陽性(判定者によっては極めて薄いラインを見逃す可能性がある)、「-」は陰性(判定者に関わらずラインが確認できない)を示しています。

3:備考における(?)は製造ラインでの混入もしくは原材料でのキャリアオーバーの可能性が否定できないことを示しています。

4 ライ麦は「FASTKIT エライザシリーズ」および「FASTKIT イムノクロマトシリーズ」において偽陽性を示すことが確認されています(4 ページ参照)。加熱処理を施したライ麦のため、「FASTKIT イムノクロマトシリーズ」では反応が認められなかったと考えられます。

試験結果(そばキットにおける不一致検体)：

| 検体名 | 表示の有無 | | | | | エライザ 測定結果(ppm) | イムノクロマト 試験結果 | 備考 |
|--------|-------|---|----|----|-----|-------------------|-----------------|---------------------|
| | 卵 | 乳 | 小麦 | そば | 落花生 | | | |
| 増粘多糖類 | × | × | × | × | × | 7.1 | - | ELISA キット偽陽性(増粘多糖類) |
| 味付けもずく | × | × | | × | × | 1.1 | - | ELISA キット偽陽性(増粘多糖類) |
| ゼリー | × | × | × | × | × | 10.7 | - | ELISA キット偽陽性(増粘多糖類) |
| 豆菓子 | × | × | | × | × | 1.3 | - | ELISA キットの偽陽性(?) |
| 食パン | | | | × | × | <10 | ± | イムノクロマトキット偽陽性(原因不明) |
| ハンバーグ | × | | | × | × | <10 | ± | イムノクロマトキット偽陽性(原因不明) |
| コロツケ | | | | × | × | <10 | ± | イムノクロマトキット偽陽性(原因不明) |
| クッキー | | | | × | × | <10 | ± | イムノクロマトキット偽陽性(原因不明) |

- 1：表示の有無における 〇は表示有り、×は表示なし、欄外表示もしくは原材料の一部に含まれるを示しています。
- 2：「+」は弱々陽性(判定者によっては極めて薄いラインを見逃す可能性がある)、「-」は陰性(判定者に関わらずラインが確認できない)を示しています。
- 3：備考における(?)は製造ラインでの混入もしくは原材料でのキャリアオーバーの可能性が否定できないことを示しています。

試験結果(落花生キットにおける不一致検体)：

| 検体名 | 表示の有無 | | | | | エライザ 測定結果(ppm) | イムノクロマト 試験結果 | 備考 |
|--------|-------|---|----|----|-----|-------------------|-----------------|---------------------|
| | 卵 | 乳 | 小麦 | そば | 落花生 | | | |
| ひじきサラダ | × | × | | × | × | <10 | ± | イムノクロマトキット偽陽性(枝豆) |
| 増粘多糖類 | × | × | × | × | × | 10< | - | ELISA キット偽陽性(増粘多糖類) |
| ゼリー | × | × | × | × | × | 2.5 | - | ELISA キット偽陽性(増粘多糖類) |
| カツメئن | × | × | | × | × | <10 | ± | イムノクロマトキット偽陽性(原因不明) |
| ハンバーグ | × | | | × | × | <10 | +w | イムノクロマトキット偽陽性(原因不明) |

- 1：表示の有無における 〇は表示有り、×は表示なし、欄外表示もしくは原材料の一部に含まれるを示しています。
- 2：「+w」は弱陽性(判定者に関わらず薄いラインが確認できる)、「+」は弱々陽性(判定者によっては極めて薄いラインを見逃す可能性がある)、「-」は陰性(判定者に関わらずラインが確認できない)を示しています。

FASTKIT™ イムノクロマト 操作マニュアル

日本ハム株式会社
中央研究所

検査に必要なもの：

1．食品の前処理および試料溶液調製

- | | | |
|-----------------|-------|---|
| 1)粉砕機 | | 食品サンプルを破碎・均一化するために使用。市販のフードカッター、ミルサーでも代用可能。 |
| 2)秤 | | 均一化した食品サンプルを 2g 秤量するために使用。 |
| 3)ホモジナイザー | | 均一化したサンプルからの抽出操作に使用。市販のミルサーでも代用可能。カップ（ガラス製）および刃が別売りで入手可能なものを推奨。 |
| 4)遠心分離機 | | 3,000 × g、4 での遠心分離が可能なものを推奨。（4 での遠心分離は脂肪の分離に有効。） |
| 5)遠心管 | | 50mL 容量以上のものを推奨。抽出後のサンプル用とろ過後のサンプル用に1食品サンプルにつき2本必要。 |
| 6)ろ紙 | | 通常のろ紙を使用。No.5A (ADVANTEC) に相当するものを推奨。 |
| 7)漏斗 | | ろ過操作に使用。5 ページの写真のようにろ紙のみで行うことも可能。 |
| 8)メスシリンダー、ビーカー | | 濃縮抽出用緩衝液を希釈するために使用。 |
| 9)マイクロピペット | | 検体の希釈と試料溶液の滴下に使用（10～1,000 μL 分取可能なもの）。 |
| 10)試験管、マイクロチューブ | | 検体の希釈時に使用。 |

*1 食品サンプルの破碎・均一化と抽出には同一の器具を使用することが可能です。ただし、破碎・均一化の際と抽出操作の際には、別々なカップと刃を使用してください。

*2 粉砕機やホモジナイザー等を介して、特定原材料が混入する場合があります。必ず食品サンプルごとにカップと刃を交換してください。また、それらの洗浄についても、4 ページに示した洗浄操作例を参考にして、確実に洗浄してください。

2．テストプレート操作

- 1)FASTKIT イムノクロマト
テストプレート
希釈用緩衝液
- 2)マイクロピペットおよびマイクロチップ
- 3)タイマーもしくはストップウォッチ
- 4)ボルテックスミキサー（試験管ミキサー，攪拌機）
- 5)試験管、マイクロチューブ

操作手順：

1．試薬の調製

1) 希釈用緩衝液（青ラベル）および濃縮抽出用緩衝液（赤ラベル）を室温に戻してください。

- *1 希釈用緩衝液および濃縮抽出用緩衝液は「FASTKIT イムノクロマトシリーズ」ですべて同一組成のため、キットの種類を問わずに使用できます。
- *2 濃縮抽出用緩衝液中に沈殿が認められる場合には、室温に戻し沈殿を溶解させた後、精製水にて希釈してください。
- *3 濃縮抽出用緩衝液のみ「FASTKIT イムノクロマトシリーズ」および「FASTKIT エライザシリーズ」で同一組成のため、共通に使用することができます（希釈用緩衝液は組成が異なります）。



2) 使用するテストプレートをアルミパウチ袋に入れたまま、室温に戻してください。



- *1 テストプレートは吸湿の影響により、正しい結果が得られないことがあるため、1時間程度室温に放置し、十分室温に戻した後、アルミパウチ袋から取り出してください。
- *2 テストプレートの試料滴下部および判定部には直接手などで触れないでください。
- *3 検体の取り違えなどを防ぐために、テストプレート上のプラスチック部分（試料滴下部と判定部の間など）に検体名や検体番号を記載しておくことを推奨します。

3) 濃縮抽出用緩衝液は、精製水を用いて 10 倍希釈してください。

- *1 濃縮抽出用緩衝液は用時調製する必要はありません。あらかじめまとめて調製し室温で保存しておくことが可能です。ただし、緩衝液中に沈殿や濁りが認められる場合には新たに調製してください。

2. 試料溶液の調製

- * 試料溶液の調製方法は、「FASTKIT エライザシリーズ」と同じ操作手順であり、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」(食発第 1106001 号) に準拠しています。

1) 食品サンプルの均一化 (破砕)

食品サンプルを粉砕機により均一な状態に破砕またはペーストとします。

< 使用器具例 1 : フードカッター (MK-K48 ; ナショナル) >



< 使用器具例 2 : ミルサー (IFM700G ; iwatani) >



- * 1 均一化の目的は、食品中には特定原材料が偏って混入している可能性が高いため、食品を均一な状態にすることです。そのため、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」の中では、『食品サンプルの一包装単位をすべて破砕すること』と記載されています。

例) : カップラーメンでは、麺、かやく、スープをすべてまとめて均一化する。

- * 2 液状の食品 (ジュースなど) や粉状の食品 (小麦粉など) は均一化 (破砕) の必要はありません。

- * 3 食品の種類、形態、成分に応じて、条件検討を加える必要がある場合があります。

例 1) : 飴などの硬い食品では、あらかじめ砕いた状態で均一化する。

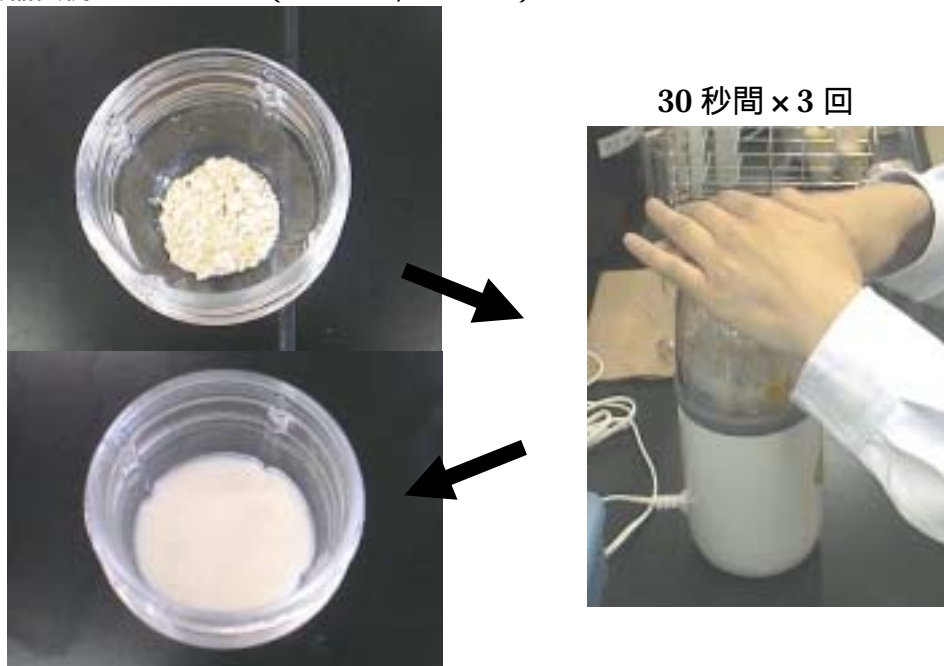
例 2) : 粘性の高い食品 (ガムなど) は均一化操作が困難な場合があります。その場合は、はさみなどでできるだけ細かく切り刻んでください。

- * 4 破砕後のサンプルは、再検査が必要な時のために保管しておくことを推奨します。保管方法は、食品サンプルの保存方法に従ってください。保存可能な期間については食品ごとに異なります。

2) 破碎した食品サンプルからのタンパク質の抽出

破碎した試料 2g に対して、あらかじめ調製した抽出用緩衝液 38mL を加え、ホモジナイザー等で 30 秒間ずつ 3 回抽出操作を繰り返します。

< 使用器具例 1 : ミルサー (IFM700G ; iwatani) >



< 使用器具例 2 : ミルタイプホモジナイザー (EXCEL AUTO HOMOGENIZER ; 日本精機) >
12,000rpm 1 分間 x 3 回



*1 液状の食品(ジュースなど)は抽出操作を行う必要はありません。

*2 食品の種類、形態、成分に応じて、条件検討を加える必要がある場合があります。

例) : 粘性の高い食品や吸水もしくは吸湿性の高い食品では、抽出操作が困難な場合があります。その場合には、抽出用緩衝液を追加し、希釈倍率を上げて抽出操作を行ってください。

*3 検体溶液の調製時に使用する器具を介して、特定原材料が混入する場合があります。よく洗浄した器具または Disposable の器具を使用してください。粉碎機やホモジナイザー等も下記に示した洗浄操作例を参考にして確実に洗浄してください。

< 洗浄操作例 >

- 1) 流水洗浄後、中性洗剤を用いてこすり洗い。
- 2) アルカリ洗剤に一晩浸け置き (超音波洗浄の併用を推奨) 。
- 3) 流水洗浄により、洗剤を洗い流す。

*4 一日に処理可能な検体数は、粉碎機およびホモジナイザー等のカップと刃の数により決まります (洗浄に時間を要するため)。そのため、一日の予測検体数に応じて、カップと刃を用意する必要があります。

3) 抽出液の遠心分離

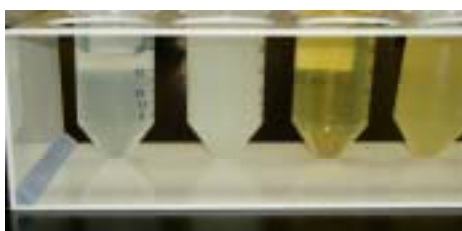
2)の抽出液中の大きな不溶性成分を除去するために、 $3,000 \times g$ 以上で4,20分間遠心分離します。



- *1 食品サンプル中の脂肪分により正しい結果が得られないことがあるため、4で遠心分離し除去する必要があります。冷却機能付ではない遠心分離機を使用する場合は、抽出液を冷蔵庫あるいは氷水中などで30分以上静置し、脂肪を分離させた後、遠心分離を行ってください。
- *2 抽出液を低温下で静置し脂肪を分離させる方法を用いる場合は、卓上遠心分離機など小型の遠心分離機でも、問題はありません。ただし、上清が不足しないよう1検体につき数本のマイクロチューブを遠心分離してください。

4) ろ過

遠心分離後の上清をろ紙(例: No.5A, ADVANTEC)を用いてろ過します。



- *1 遠心上清に浮遊している細かい不溶性成分と脂肪分を除去します。低温で固形化した脂肪が溶けないうちに除去してください。脂肪が固形化していない場合は、あらかじめピペット等を用いて上清表面の脂肪層を除去してからろ過してください。
- *2 ろ液は「FASTKIT イムノクロマトシリーズ」だけでなく、「FASTKIT エライザシリーズ」にも使用できます。ただし、ろ液を希釈する希釈用緩衝液は、両キットで組成が異なりますので、「FASTKIT イムノクロマトシリーズ」用の希釈と「FASTKIT エライザシリーズ」用の希釈は別々に行ってください。
- *3 ろ液は、4で保存し、なるべく早く試験を行ってください(食品サンプルにより保存可能な期間が異なります)。また、ろ液の凍結融解は避けてください。

5) ろ液の希釈

ろ液を希釈用緩衝液で10倍希釈して試料溶液とします。ただし、牛乳キットはろ液を希釈用緩衝液で**5倍**希釈して試料溶液とします。

- *1 希釈用緩衝液は「FASTKIT イムノクロマトシリーズ」ですべて同一組成のため、キットの種類を問わずに使用できます。
- *2 牛乳キットのみ希釈倍率が異なりますので、牛乳キットと他のキットを同時に使用する場合は、以下に示した希釈操作例を参考にして、ろ液の希釈を行ってください。

< 希釈操作例 >

- 1) ろ液 $200 \mu\text{L}$ に対し希釈用緩衝液 $800 \mu\text{L}$ を加えて、牛乳キット用5倍希釈試料溶液とします。
- 2) 5倍希釈した牛乳キット用試料溶液 $500 \mu\text{L}$ に対し、希釈用緩衝液 $500 \mu\text{L}$ を加えて、卵キット、小麦キット、そばキット、落花生キット用10倍希釈試料溶液とします。

3 . テストプレートの操作

1) テストプレートの準備

あらかじめアルミパウチ袋に入れたまま室温に戻したテストプレートを使用直前にアルミパウチ袋から取り出してください。



- *1 テストプレートは吸湿の影響により、正しい結果が得られないことがあるため、1時間程度室温に放置し、十分室温に戻した後、アルミパウチ袋から取り出してください。
- *2 テストプレートの試料滴下部および判定部には直接手などで触れないでください。
- *3 検体の取り違いなどを防ぐために、テストプレート上のプラスチック部分（試料滴下部と判定部の間など）に検体名や検体番号を記載しておくことを推奨します。

2) 試料溶液の滴下



前項『2 . 試料溶液の調製』に従って調製した試料溶液を、ボルテックスミキサー等を用いて十分攪拌してください。

マイクロピペットを用いて、試料溶液 100 μ L をテストプレートの『試料滴下部』に滴下してください。

試料溶液の滴下と同時にタイマーもしくはストップウォッチなどを用いて時間の計測を開始してください。

そのまま 15 分間静置してください。

15 分後に次項『4 . 結果の判定』に従って判定してください。

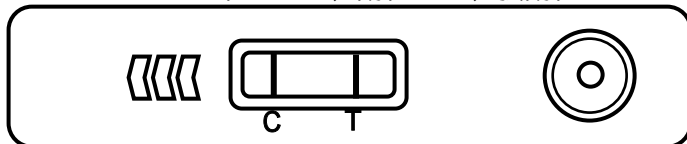
- *1 試験は必ず水平な台の上で行い、判定まではテストプレートを動かさないでください。
- *2 マイクロピペットのチップは必ずテストごとに交換してください。
- *3 試料溶液の粘性が高く、試料滴下部に吸収されない、テストプレート上を展開しないなどの現象が認められた場合には、試料溶液をさらに希釈用緩衝液にて希釈した後、試験を行ってください。また、試料溶液の色調により判定部に着色が認められ、赤紫色のラインの確認が困難な場合にも同様の処置をしてください。

4. 結果の判定

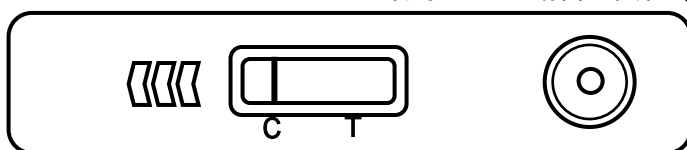
試料溶液を滴下し、15 分間経過した後、下記の判定例に従い目視で判定してください。

< 判定例 >

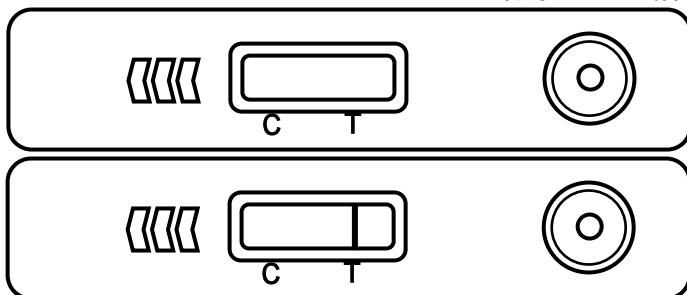
- 1) 陽性の場合： 判定部 (T：判定窓右) および判定部 (C：判定窓左) 共に赤紫色のラインが観察されたら陽性です。赤紫色のラインの濃淡に応じて、弱陽性を +w、陽性を +、強陽性を ++ とします。



- 2) 陰性の場合： 判定部 (T) に赤紫色のラインが観察されず、判定部 (C) のみに赤紫色のラインが観察される場合は陰性 (-) です。



- 3) 判定保留 (再試験) の場合： 判定部 (T) および判定部 (C) 共に赤紫色のラインが観察されない場合、判定部 (T) のみに赤紫色のラインが観察される場合は再試験してください。



- *1 試験開始後 15 分の結果を判定結果としてください。食品サンプル中の成分などの影響により、時間の経過とともに判定結果が変化する場合がありますが、必ず、試験開始後 15 分の結果を判定結果としてください。
- *2 赤紫色のラインの濃淡に関わらずラインが確認された場合には陽性と判定してください。
- *3 判定部 (C) に認められる赤紫色のラインは試料溶液が正常に展開部を移動したことを確認するためのラインであり、判定部 (T) の赤紫色のラインと比較するための指標ではありません。
- *4 赤紫色のラインの濃淡と試料溶液中の特定原材料由来のタンパク質量は必ずしも一致しません。本キットは食品サンプル中の特定原材料由来のタンパク質の有無を確認するためのキットです。従って、本キットで陽性と判定された食品サンプルは必ず、「FASTKIT エライザシリーズ」にて特定原材料タンパク質含有量を確認してください。

製造元

NIPPONHAM 日本ハム株式会社 中央研究所

茨城県つくば市緑ヶ原 3-3 〒300-2646

電話：029(847)7825 FAX：029(847)7824